

Politechnika Łódzka

ZESZYTY NAUKOWE Nr 1074

BEATA GUTAROWSKA

GRZYBY STRZĘPKOWE
ZASIEDLAJĄCE MATERIAŁY BUDOWLANE
WZROST ORAZ PRODUKCJA MIKOTOKSYN I ALERGENÓW

ŁÓDŹ 2010

ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
SCIENTIFIC BULLETIN OF THE TECHNICAL UNIVERSITY
OF LODZ
BULLETIN SCIENTIFIQUE
DE L'UNIVERSITÉ POLYTECHNIQUE DE LODZ
НАУЧНЫЕ ЗАПИСКИ
ЛОДЗИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
WISSENSCHAFTLICHE HEFTE
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT IN LODZ

Redaktor Działu: **prof. dr hab. inż. Piotr Wodziński**

Recenzenci: **prof. dr hab. inż. Beata Cwalina**
prof. dr hab. Zdzisław Libudysz

©Copyright by Politechnika Łódzka 2010

Adres Redakcji – Адрес Редакции – Editor's Office
Adresse de Redaction – Schriftleitungsadresse:

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223
tel./fax 42-684-07-93
e-mail: a-row-1@adm.p.lodz.pl
www.wydawnictwa@p.lodz.pl

ISSN 0137-4834

Nakład 140 egz. Ark. druk. 11,0. Papier offset. 80 g, 70 x 100
Druk ukończono we wrześniu 2010 r.
Wykonano w Drukarni Quick-Druk, 90-562 Łódź, ul. Łąkowa 11

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	6
STRESZCZENIE	9
1. PRZEGLĄD LITERATURY	12
1.1. Grzyby strzępkowe – ogólna charakterystyka	12
1.2. Porażenia grzybami strzępkowymi pomieszczeń mieszkalnych – skala zjawiska	15
1.3. Grzyby strzępkowe w budynkach	16
1.4. Wpływ grzybów strzępkowych na zdrowie ludzi	18
1.5. Mikotoksyny	23
1.5.1. Wpływ mikotoksyn na zdrowie mieszkańców	27
1.5.2. Cytotoksyczność mikotoksyn	28
1.5.3. Genotoksyczność mikotoksyn	30
1.6. Inne substancje aktywne biologicznie wytwarzane przez grzyby strzępkowe	31
1.7. Czynniki warunkujące wzrost grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych.....	32
1.8. Materiały budowlane jako podłoże do wzrostu grzybów strzępkowych	37
2. GENEZA I CEL PRACY	42
3. METODYKA BADAŃ	44
3.1. Obiekt badań środowiskowych – mieszkania i mieszkańcy	44
3.2. Charakterystyka materiału biologicznego.....	45
3.3. Pożywki mikrobiologiczne	48
3.4. Materiały budowlane	50
3.5. Wilgotność materiałów budowlanych.....	50
3.6. Analiza mikologiczna w budynkach mieszkalnych	51
3.6.1. Analiza mikologiczna powierzchni przegród budowlanych.....	51
3.6.2. Analiza mikologiczna powietrza pomieszczeń.....	51
3.6.3. Identyfikacja grzybów strzępkowych	54
3.7. Oznaczanie ergosterolu	54
3.7.1. W powietrzu	54
3.7.2. Na przegrodach budowlanych	54
3.7.3. Na materiałach budowlanych porażonych przez grzyby strzępkowe	54
3.8. Hodowle laboratoryjne grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych.....	55

3.8.1. Przygotowanie zawiesiny zarodników grzybów strzępkowych	55
3.8.2. Przygotowanie materiałów budowlanych do badań	55
3.8.3. Hodowle grzybów strzępkowych	55
3.9. Oznaczanie mikotoksyn	56
3.9.1. Metoda chromatografii cienkowarstwowej (TLC)	56
3.9.2. Metoda immunoenzymatyczna Elisa	57
3.9.3. Metoda HPLC – MS/MS	58
3.10. Oznaczanie cytotoksyczności ogólnej	58
3.11. Oznaczanie genotoksyczności	60
3.12. Badania mieszkańców	61
3.12.1. Kwestionariusz wywiadu lekarskiego	61
3.12.2. Punktowe testy skórne SPT	61
3.12.3. Oznaczanie antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE oraz klasy asIgE w surowicy krwi	62
3.13. Oznaczanie w surowicy krwi przeciwciał przeciwko alergenom pleśni obecnym w budynkach	62
3.14. Ekstrakcja białek alergennych pleśni	63
3.15. Elektroforeza SDS-PAGE	63
3.16. Immunoblotting	64
3.17. Obliczenia matematyczne	64
4. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE	66
4.1. Badania środowiskowe	66
4.1.1. Charakterystyka pomieszczeń mieszkalnych i analiza przyczyn zagrzybienia	66
4.1.2. Rozwój grzybów strzępkowych w pomieszczeniach mieszkalnych	68
4.1.3. Mikotoksyny na przegrodach budowlanych oraz ich cytotoksyczność i genotoksyczność	78
4.1.4. Stan zdrowia mieszkańców	80
4.2. Badania laboratoryjne	86
4.2.1. Wzrost grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych – badania modelowe	86
4.2.2. Wpływ zanieczyszczeń w postaci kurzu oraz związków organicznych na wzrost grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych	90
4.2.3. Wpływ wilgotności materiału budowlanego na wzrost grzybów strzępkowych	93
4.2.4. Mikotoksyny w materiałach budowlanych	97

4.2.5. Cytotoksyczność i genotoksyczność materiałów budowlanych porażonych przez grzyby strzępkowe.....	102
4.2.6. Wpływ rodzaju materiału budowlanego, wilgotności oraz obecności zanieczyszczeń na tworzenie mikotoksyn na materiałach budowlanych	105
4.2.7. Wpływ rodzaju materiału budowlanego na tworzenie białek alergennych.....	111
5. DYSKUSJA WYNIKÓW	118
6. WNIOSKI	137
LITERATURA	139
SUMMARY.....	159
CHARAKTERYSTYKA ZAWODOWA AUTORA.....	162

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

ABPA	– ang. <i>Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis</i> , aspergiloza płucna o przebiegu alergicznym,
AFL B ₁	– aflatoksyna B ₁ , mikotoksyna,
Alt a 1	– oznaczenie białka alergennego (skrót liter- skrót od nazwy gatunkowej grzyba – <i>Alternaria alternata</i> , cyfra – numer sklasyfikowanego alergenu – 1),
as IgE	– ang. <i>allergen specific Immunoglobulin E</i> , alergenowo swoiste przeciwciała klasy IgE,
a _w	– ang. <i>water activity</i> , aktywność wody, wskaźnik równowagi higroskopijnej,
BSL	– ang. <i>Biosafety Level</i> , klasyfikacja biobezpieczeństwa grzybów,
DAS	– diacetoksycirpenol, mikotoksyna,
DON	– deoksyniwalenol (womiotoksyna), mikotoksyna,
Elisa	– ang. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , test immunoenzymatyczny,
ENHIS	– ang. <i>European Environmental and Health Information System</i> , Europejski System Informacji o Środowisku i Zdrowiu,
HeLa komórki	– linia komórkowa wywodzącą się z komórek raka szyjki macicy,
HPLC	– ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa,
HPLC – DAD	– ang. <i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem fotodiodowym,
HPLC – MS	– ang. <i>High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa ze spektrometrią masową,
HPLC – MS/MS	– ang. <i>High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry /Mass Spectrometry</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemem spektrometrii masowej,
HPLC – UV/VIS	– ang. <i>High Performance Liquid Chromatography with UV/VIS Detector</i> , wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem UV/VIS,
IC ₅₀	– ang. <i>Inhibitory Concentration</i> , stężenie trucizny, które o 50%, w porównaniu z próbą kontrolną, hamuje rozwój organizmów (np. bakterii) lub proliferację komórek (test MTT, XTT),
IgE	– immunoglobuliny E, klasa przeciwciał,

IL – 6	– interleukina 6, najważniejsza i najbardziej wielokierunkowo działająca cytokina uwalniana przez monocyty i makrofagi,
IPH	– ang. <i>Idiopathic Pulmonary Hemosiderosis</i> , hemosyderoza płuc,
IUISA	– ang. <i>International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee</i> , Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych, Podkomitet Nazewnictwa Alergenowego,
jtk	– ang. <i>cfu – colony forming units</i> , jednostki tworzące kolonie,
kDa	– kilodalton (1 kDa = 1000 Da), jednostka masy cząsteczkowej białek,
KU/I	– ilościowa jednostka przeciwciał klasy IgE w surowicy krwi, 1 U odpowiada 2,44 ng IgE,
MLA test	– ang. <i>The Mouse Lymphoma Assay</i> , test genotoksyczności na mysich komórkach chłoniaka,
MTT test	– ang. MMT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay, test MTT redukcji soli tetrazolowej bromku 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolowego – metoda oznaczania cytotoksyczności,
MVOCs	– ang. <i>Microbial Volatile Organic Compounds</i> , mikrobiologiczne, organiczne metabolity lotne,
NIV	– niwalenol, mikotoksyna,
OTA	– ochratoksyna A, mikotoksyna,
PAT	– patulina, mikotoksyna,
PCR	– ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy,
PCV	– polichlorek winylu, tworzywo sztuczne,
RCF	– ang. <i>Relative Centrifugal Force</i> , siła odśrodkowa wirowania wyrażana jako wielokrotność przyspieszenia ziemskiego (g)
Rf	– ang. <i>Retardation factor, retention (value) factor</i> – wskaźnik opóźnienia, (wskaźnik retencji) – pojęcie stosowane w chromatografii cienkowarstwowej; jest to iloraz odległości przebytej przez substancję rozdzielaną przez odległość przebytą przez czoło eluentu (układu rozwijającego),
S _{1/2log}	– szybkość syntezy ergosterolu w połowie fazy logarytmicznej wzrostu (μg ergosterolu/g materiału/dobę),
S _{max}	– maksymalna szybkość syntezy ergosterolu (μg ergosterolu/g materiału/dobę),
SBS	– ang. <i>Sick Building Syndrom</i> , Syndrom Chorego Budynku,
SDS – PAGE	– ang. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ,

	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, stosując SDS – sól sodową siarczanu dodecyłu,
SPT	– ang. <i>Skin Prick Test</i> , punktowe testy skórne w ocenie alergii,
ST	– sterigmatocystyna, mikotoksyna,
TFT	– trifluorotymidyna, analog pirymidyny, odczynnik cytotoksyczny wykorzystywany w teście genotoksyczności MLA,
TK	– kinaza tymidynowa, enzym, którego mutacja genu badana jest w teście genotoksyczności MLA,
TLC	– ang. <i>Thin Layer Chromatography</i> , chromatografia cienkowarstwowa,
TNF	– ang. <i>Tumor Necrosis Factor</i> , czynnik martwicy nowotworu,
TPZ	– toksyczna powierzchnia zainfekowana grzybami pleśniowymi (Piontek, 2004),
WWP	– wilgotność względna powietrza (%),
XTT test	– ang. <i>XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) Assay</i> , test XTT redukcji soli sodowej 3'-(1(fenyloaminokarbonylo)-3,4-tetrazolio)-bis (4-metoksy-6-nitro) benzeno-sulfonowego kwasu – metoda oznaczania cytotoksyczności.

STRESZCZENIE

Grzyby strzępkowe występują powszechnie, a ich aktywny rozwój obserwuje się między innymi na przegrodach budowlanych w pomieszczeniach mieszkalnych pod warunkiem odpowiednio wysokiej wilgotności. Znane są ich właściwości toksynotwórcze i alergenne ujawniane podczas wzrostu na zdefiniowanych podłożach mikrobiologicznych, jednak właściwości te podczas rozwoju grzybni na materiałach budowlanych są odmienne. W rutynowych badaniach mikologicznych pomieszczeń wyizolowane gatunki grzybów identyfikuje się i charakteryzuje pod względem toksynotwórczości i alergenicności, wyłącznie na podstawie literatury.

Badania 72 pomieszczeń mieszkalnych z objawami zagrzybienia, w których pleśń występowała na przegrodach budowlanych, średnio w ilości 7×10^7 jtk/100 cm², w powietrzu wewnętrznym w ilości 3×10^3 jtk/m³, a zawartość ergosterolu w powietrzu sięgała poziomu 2,6 µg/m³, wykazały, iż głównym czynnikiem sprzyjającym ich rozwojowi jest wilgotność względna powietrza powyżej 60%. Stwierdzono, że grzyby strzępkowe rozwijały się na większości badanych materiałów budowlanych, wykończeniowych i termoizolacyjnych. Najczęściej zasiedlały materiały pochodzenia organicznego, w skład których wchodzi celuloza lub białka (drewno, płyty gipsowo-kartonowe, tapety oraz skórę tapicerską). Materiały nieorganiczne (zaprawa tynkarska, gips, cement) nie sprzyjały rozwojowi grzybów.

Wśród grzybów strzępkowych zasiedlających przegrody budowlane, a także obecnych w powietrzu wewnętrznym, najczęściej występowały pleśnie należące do rodzajów: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Trichoderma*. W budynkach zagrzybionych stwierdzono większą różnorodność pleśni i dominację grzybów z rodzaju *Aspergillus* (głównie *A. versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*).

Użytkownicy zagrzybionych pomieszczeń skarżyli się na liczne objawy chorobowe, wśród których często występowały objawy alergii i Zespołu Chorego Budynku (SBS). Gatunkami pleśni, które przyczyniały się do powstania alergii u mieszkańców były *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger*. Stwierdzono, iż najczęstszą reakcją alergiczną u mieszkańców wywołują białka tworzone przez *Penicillium expansum* o masie cząsteczkowej 88 kDa i 70 kDa (Pen c 19) oraz przez *Alternaria alternata* o masie 30 kDa (Alt a 1) i 53 kDa (Alt a 10).

Badania przegród budowlanych w zagrzybionych mieszkaniach nie wykazały ani związków toksycznych wytwarzanych przez pleśń, ani też oddziaływań cyto- i genotoksycznych. Jednocześnie zły stan zdrowia mieszkańców dał podstawy do sformułowania celu pracy i poszukiwania odpowiedzi na pytanie: jak kształtują

się wzrost oraz toksynotwórczość i alergenicność grzybów strzępkowych zasiedlających materiały budowlane i wykończeniowe, stosowane obecnie w budownictwie oraz jakie czynniki środowiskowe wpływają na ujawnienie się tych cech?

Grzyby strzępkowe wyizolowane z przegród budowlanych, należące do gatunków *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum* w warunkach laboratoryjnych, rosnąc na podłożach oraz na materiałach budowlanych, ujawniły zdolność do syntezy groźnych dla zdrowia mikotoksyn: aflatoksyn, sterigmatocystyny, roquefortyny C, meleagriny i wielu innych. Ekstrakty z materiałów budowlanych zasiedlonych przez te pleśnie wykazywały cytotoksyczność wobec fibroblastów mysich w teście MTT/XTT. Cytotoksyczność pleśni zależała od rodzaju i stężenia mikotoksyn wytwarzanych na materiałach budowlanych. Cytotoksyczność mikotoksyn tworzonych na materiałach budowlanych była większa niż roztworów czystych preparatów mikotoksyn o wyższym stężeniu. Efekt ten może wynikać z synergistycznego oddziaływania toksyn i innych metabolitów tworzonych przez pleśnie w środowisku budowlanym.

W warunkach laboratoryjnych wykazano, iż materiały budowlane i wykończeniowe pochodzenia organicznego, zawierające celulozę oraz białka, w warunkach wysokiej wilgotności sprzyjały nie tylko wzrostowi pleśni, ale również tworzeniu przez nie mikotoksyn i alergenów, czego nie potwierdzono w przypadku materiałów nieorganicznych. Tworzenie mikotoksyn na materiałach budowlanych było aktywowane obecnością białek i sacharydów dodawanych w postaci pożywek mikrobiologicznych lub kurzu domowego. Zahamowanie wzrostu pleśni oraz produkcji mikotoksyn stwierdzono na cemencie oraz na płytach gipsowo-kartonowych zawierających w swoim składzie biocydy i związki hydrofobowe (silikon).

Nie stwierdzono genotoksyczności materiałów budowlanych porażonych przez toksynotwórcze grzyby strzępkowe, ani też preparatów aflatoksyny B₁ i sterigmatocystyny w stężeniach 100 i 20 µg/ml, wobec komórek chłoniaka myszy w teście MLA.

Materiały budowlane okazały się środowiskiem korzystniejszym do wytwarzania białek alergennych, niż pożywki laboratoryjne. Wykryto 39 białek alergennych tworzonych przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych, w tym 16 białek o masie cząsteczkowej od 11 kDa do 93 kDa, do tej pory niesklasyfikowanych przez International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee oraz 23 białka alergenne opisane i sklasyfikowane. Zaobserwowano również, że grzyby strzępkowe podczas wzrostu na materiałach budowlanych wytwarzały specyficzne mikotoksyny i białka alergenne, których nie wykrywano podczas ich wzrostu na pożywkach mikrobiologicznych. Przykładami są tentoksyna, kwas 3-nitropropionowy oraz liczne białka alergenne. Wskazuje to na konieczność

przewodzenia badań właściwości toksycznych i alergennych pleśni podczas ich hodowli na materiałach budowlanych, w warunkach podobnych do występujących w budynkach (odpowiednia wilgotność, dodatek kurzu domowego).

Stwierdzono, iż ocena zagrożenia zdrowotnego mieszkańców powinna uwzględniać oznaczanie toksynotwórczości, cytotoksyczności i alergenicności pleśni wyizolowanych z budynków. W badaniach tych należy uwzględnić potwierdzenie alergii na pleśnie metodą immunoblottingu z wykorzystaniem ekstraktów białek pleśni wytwarzanych na materiałach budowlanych.

Uzyskane w pracy wyniki wskazały, iż zły stan zdrowia mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń jest spowodowany głównie przez białka alergenne, których nośnikiem w powietrzu wewnętrznym są fragmenty grzybni oraz zarodniki pleśni, a materiały budowlane są korzystnym podłożem do ich wytwarzania. Jednak potwierdzona możliwość syntezy mikotoksyn przez pleśnie na materiałach budowlanych świadczy także o ryzyku obecności tych metabolitów w mieszkaniach i oddziaływania na zdrowie mieszkańców.

1. PRZEGLĄD LITERATURY

1.1. Grzyby strzępkowe – ogólna charakterystyka

Grzyby strzępkowe, potocznie nazywane pleśniami lub grzybami nitkowatymi, są szeroko rozpowszechnione na kuli ziemskiej; rozwijają się w glebie, wodzie, na materiałach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a ich zarodniki można znaleźć w powietrzu oraz na różnych powierzchniach, także syntetycznych.

Organizmy te zaliczamy do domeny *Eukarya* (jądrowce), królestwa *Fungi* (grzyby). Według obecnej klasyfikacji wyróżniamy osiem gromad grzybów: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Microspora*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota* (Bisby i in., 2009). Wśród grzybów strzępkowych zasiedlających materiały budowlane dominują gatunki należące do gromad *Ascomycota*, *Neocallimastigomycota* oraz *Zygomycota*. W gromadzie *Ascomycota* wyodrębniono tzw. sztuczne rodzaje – *Aspergillus* i *Penicillium*; podobnie w gromadzie *Neocallimastigomycota* wydzielono sztuczny takson grzybów anamorficznych (anamorf – stadium niedoskonałe, u którego nie stwierdzono rozmnażania płciowego) (Bisby i in., 2009). Grzyby te wykazują pokrewieństwo filogenetyczne z gromadami, do których należą, jednak nie zaobserwowano u nich typowego dla rodzajów rozmnażania płciowego. Jeżeli jednak w trakcie identyfikacji okazuje się, iż gatunek ma stadium doskonałe (płciowe), przenosi się go do odpowiedniego rodzaju. Stosowane obecnie badania molekularne, umożliwiające poznanie sekwencji DNA i RNA, pozwoliły ustalić pokrewieństwo wielu gatunków grzybów zaliczanych kiedyś do taksonu grzybów anamorficznych (Kirk i in., 2001), a wcześniej do gromady *Fungi imperfecti* (*Deuteromycota*).

Grzyby strzępkowe to z reguły organizmy wielokomórkowe, których ciało złożone jest z nitkowatych strzępek tworzących rozgałęzioną grzybnie, penetrującą podłoże wzrostu. Wzrost grzybni odbywa się w części szczytowej strzępek (apikalnej). Komórki grzybów otacza ściana komórkowa zbudowana z chityny, glukanu, lipidów i białek; wykazuje ona wysoką oporność na działanie enzymów litycznych i różnych czynników środowiska. Strzępki grzybów mogą mieć budowę niepodzielną przegrodami (wtedy komórki są wydłużone, wielojądrowe) albo podzielną ścianami poprzecznymi (septami) (Piotrowska i Żakowska, 2007).

Pleśnie rozmnażają się za pomocą zarodników (spor), które są komórkami zazwyczaj nieruchliwymi; łatwo rozprzestrzeniają się za pomocą wiatru, wody lub zwierząt. Zarodniki powstają w obrębie specjalnych struktur reprodukcyjnych

w procesie płciowym lub bezpłciowym. Występują trzy typy struktur reprodukcyjnych: gametangia (tworzą gamety), sporangia (tworzą zarodniki), konidiofory (wyspecjalizowane strzępki tworzące konidia). Sposób rozmnażania i tworzenia zarodników jest uzależniony od gatunku grzyba (Solomon i in., 2007).

Grzyby strzępkowe charakteryzuje zdolność przystosowania się do warunków panujących w środowisku – rodzaju pokarmu, czynników fizycznych, chemicznych i klimatycznych. Wszystkie grzyby jako chemoorganotrofy wymagają obecności materii organicznej żywej lub martwej, z której czerpią źródło węgla i energii. Większość z nich ma jednak małe wymagania pokarmowe; zaliczamy je do oligotrofów – organizmów, które do wzrostu wymagają niewielkiej ilości materii organicznej. Występują i takie, których wzrost jest uzależniony od obecności w środowisku konkretnego substratu organicznego, np. grzyby keratynolityczne rozwijają się w obecności keratyny. Oligotroficzny charakter odżywiania tych mikroorganizmów daje im ogromne możliwości adaptacji do różnych warunków, co wraz z łatwością rozprzestrzeniania się decyduje o zasiedleniu niemal wszystkich środowisk życia. Grzyby strzępkowe mają zdolność produkcji licznych enzymów zewnątrzkomórkowych rozkładających wiele związków trudnorozkładalnych (np. celuloza, lignina). Azot przyswajają zarówno z organicznych związków azotowych, jak również z prostych związków nieorganicznych (np. soli amonowych). Do wzrostu potrzebują obecności pierwiastków: fosforu, potasu, magnezu, wapnia, siarki, miedzi, manganu, sodu, cynku, które z reguły znajdują się w środowisku naturalnym w wystarczających ilościach. Nie wymagają obecności witamin; większość grzybów jest zdolna do ich syntetyz. Przemiana materii pleśni jest bardzo intensywna – w czasie 24 godzin masa grzybni zwiększa się 9-krotnie (Żakowska i Stobińska, 2000).

Większość grzybów strzępkowych to organizmy mezofilne rozwijające się w temperaturach 20-35°C, jednakże graniczne temperatury ich rozwoju wynoszą od -10°C do 55°C. Grzyby są wrażliwe na temperaturę powyżej 60°C; w takiej temperaturze giną wszystkie formy morfologiczne, z wyjątkiem Chlamydospor, które wymagają do zniszczenia temperatury 120°C (sterylizacja).

Pleśnie to typowe tlenowce rosnące na powierzchniach w warunkach dostępności tlenu. W warunkach beztlenowych, np. w głębiej położonych partiach gleby, materiałów technicznych mogą przetrwać zarodniki lub chlamydospory. Niektóre gatunki grzybów rosną w warunkach beztlenowych, np. *Fusarium oxysporum*.

Wartością graniczną, poniżej której wzrost pleśni jest zahamowany jest 11-14% wilgotności masowej podłoża. Pleśnie rozwijają się przy różnych poziomach wilgotności podłoża. Do aktywnego wzrostu większość grzybów wymaga wilgotności podłoża odpowiadającej aktywności wody $a_w = 0,60-0,99$. Gatunki kserofilne,

np. z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* rosną już przy niskiej wilgotności ($a_w = 0,60$). Rodzaje preferujące wysoką wilgotność, np. *Stachybotrys* rozwijają się dopiero przy $a_w = 0,99$.

Pleśnie preferują środowiska kwaśne – optymalne pH dla ich wzrostu kształtuje się na poziomie pH 5-6, ale wykazują możliwość rozwoju w szerokim zakresie pH: od 1,5 do 10. Grzyby chorobotwórcze – dermatofity rozwijają się przy pH 7,2-7,6 (Piotrowska i Żakowska, 2007).

Grzyby odgrywają ważną rolę w utrzymywaniu równowagi ekologicznej na Ziemi, pełniąc funkcję głównych reducentów. Większość gatunków to saprobionty rozkładające substancję organiczną, w tym związki, takie jak celuloza, chityna, ligniny i inne składniki ścian komórkowych roślin i zwierząt. W tych procesach uwalniają ze związków organicznych wodę, dwutlenek węgla, azot i inne pierwiastki, które mogą być ponownie wprowadzone do obiegu. Niektóre grzyby mają zdolność do życia w symbiozie z roślinami wyższymi (mikoryza); ponad 90% rodzin roślin żyje w symbiozie z licznymi grzybami strzępkowymi, głównie z gromad *Ascomycota* i *Basidiomycota* (Solomon i in, 2007).

Grzyby strzępkowe dzięki syntezie licznych metabolitów odgrywają pozytywną, znaczącą rolę w biotechnologii medycznej (produkcja antybiotyków) oraz wielu gałęziach przemysłu farmaceutycznego i spożywczego (biosynteza kwasów organicznych, enzymów, hormonów, żywności). Zdolność tych mikroorganizmów do degradacji trudnorozkładalnych związków jest wykorzystywana w procesach bioremediacji gleby, oczyszczania ścieków, utylizacji odpadów polimerowych (Żakowska i Piotrowska, 2008).

Wśród grzybów obecne są liczne patogeny, które są sprawcami chorób ludzi, zwierząt i roślin. U ludzi mogą być przyczyną schorzeń skóry, włosów, paznokci oraz organów wewnętrznych. Wiele gatunków produkuje groźne dla zdrowia substancje toksyczne – mikotoksyny, które mogą zanieczyszczać środowisko, żywność, materiały techniczne, takie jak skóra, tekstylia, materiały budowlane (Zyska, 2001b; Zyska i Żakowska, 2005). Te same enzymy, które umożliwiają grzybom strzępkowym rozkład związków organicznych naturalnych bądź syntetycznych, pozwalają im skutecznie rozkładać produkty spożywcze, drewno, tkaniny i wiele innych materiałów technicznych. Grzyby przyczyniają się do ogromnych strat ekonomicznych podczas magazynowania wielu materiałów, głównie zbóż (Chelkowski, 2010), materiałów budowlanych (Zyska, 2001b), w tym drewna (Ważny i Karyś, 2001). Również obiekty budowlane, mające specyficzny mikroklimat o podwyższonej wilgotności, mogą być zasiedlane przez grzyby strzępkowe, które przyczyniają się do ich niszczenia oraz niekorzystnie wpływają na zdrowie mieszkańców.

1.2. Porażenia grzybami strzępkowymi pomieszczeń mieszkalnych – skala zjawiska

Skala zjawiska zasiedlania i rozwoju grzybów strzępkowych w budynkach mieszkalnych jest trudna do oszacowania. Nie ma jednostek odpowiedzialnych za prowadzenie takich badań, nie prowadzi się ewidencji mieszkań z objawami zagrzybienia. W literaturze pojawiają się natomiast dane szacunkowe, oparte na badaniach przeprowadzonych w różnych krajach. Problem rozwoju grzybów strzępkowych w budynkach mieszkalnych opisywany był zarówno w krajach europejskich – Finlandii, Holandii, Wielkiej Brytanii, Danii (Hunter i in., 1988; Nevalainen i in., 1991; Verhoeff i in., 1995), w USA, Kanadzie (Miller i in., 1988; Brunekreef i in., 1989; Dales i in., 1991), jak również w Polsce (Smyk i Rywotycki, 1993; Zyska, 1999; Janińska, 2000; Piontek, 2001). W tabeli 1 przedstawiono dane dotyczące udziału zagrzybionych mieszkań w różnych krajach.

Tabela 1. Udział mieszkań porażonych grzybami strzępkowymi w różnych krajach

Kraj	Mieszkania zagrzybione (%)	
Wielka Brytania	30-45	Hunter i in., 1988; Platt i in., 1989
USA	40	Brunekreef i in., 1989
Kanada	30	Dales i in., 1991
Finlandia	20-30	Nevalainen i in., 1991
Holandia	20-25	Brunekreef, 1992; Verhoeff i in., 1995
Polska	25	Zyska, 1999

Przyczyną zagrzybienia pomieszczeń jest wysoka wilgotność powietrza i przegród budowlanych. Porażenia pleśniowe często występują w krajach o klimacie umiarkowanym morskim i kontynentalnym, jaki panuje na półkuli północnej, szczególnie w krajach skandynawskich, jak również w krajach położonych nad morzem: Holandii, Wielkiej Brytanii i Danii. Problem ten dotyczy także krajów o klimacie umiarkowanym przejściowym, w których coraz częściej obserwuje się łagodne zimy i zwiększającą się ilość opadów, takich jak np. Polska i inne kraje Europy Centralnej i Zachodniej. Brak danych szacunkowych dla krajów o klimacie równikowym, zwrotnikowym i innych nie świadczy o braku porażeń pleśniowych w budynkach mieszkalnych. W niektórych strefach tych klimatów panują warunki bardzo wysokiej wilgotności powietrza, sprzyjającej rozwojowi pleśni.

Według Zyski (1999) w 1998 roku w Polsce rozwój pleśni obserwowano w 2,7 mln pomieszczeń mieszkalnych, co stanowiło 25% wszystkich mieszkań.

Polska wprawdzie nie leży w strefie klimatu wilgotnego (poza niektórymi rejonami), jednak według szacunków ENHIS nasz kraj jest obecnie na pierwszym miejscu wśród krajów europejskich, gdzie liczba mieszkańców żyjących w zawilgoconych mieszkaniach jest największa. Według danych ENHIS z 2006 r., w Polsce 40% mieszkańców żyło w nadmiernie zawilgoconych budynkach¹. Nie w każdym budynku mieszkalnym, w którym panuje wysoka wilgotność powietrza uaktywniają się do wzrostu pleśnie, ale istnieje duże ryzyko ich rozwoju.

Badania przeprowadzone w latach 1994-2001 na terenie Wielkopolski wykazały, iż udział porażonych pleśniami mieszkań ciągle wzrasta; w czasie 7 lat zaobserwowano ich wzrost o 2,3% (Rymsza, 2003). Przyczyną nadmiernej wilgotności pomieszczeń są zmiany klimatyczne (długie wilgotne sezony jesieni i wiosny, łagodne zimy, liczne powodzie), również popularne obecnie zabiegi termomodernizacyjne, takie jak montaż podzielników ciepła, wymiana stolarki okiennej na szczelną (Janińska, 2002). Najbardziej niepokojące jest coraz częstsze występowanie zapleśnienia w nowych budynkach (Janińska, 2002, Piontek i Bednar, 2006). Badania prowadzone na terenie Łodzi wykazały, iż zagrzybienie dotyczy także starych zabytkowych kamienic z XIX wieku (Gutarowska i in., 2005). Przyczyny rozwoju pleśni w tych budynkach są prezentowane w niniejszej pracy.

Wobec przedstawionych faktów, można uznać, iż porażenie pleśniami pomieszczeń mieszkalnych w Polsce jest powszechne. Brak natomiast danych na temat skali zagrożeń zdrowotnych oraz strat materialnych.

1.3. Grzyby strzępkowe w budynkach

Grzyby strzępkowe zdolne są do wzrostu na materiałach budowlanych, przyczyniając się do ich niszczenia oraz zanieczyszczania powietrza wewnątrz pomieszczeń. Szacuje się, iż 107 gatunków grzybów strzępkowych może zasiedlać pomieszczenia mieszkalne (Zyska, 1999, 2001a). Badania wykonane w 172 mieszkaniach na terenie województwa lubuskiego wykazały obecność 74 gatunków pleśni należących do 30 rodzajów (Piontek, 2004). Do grzybów strzępkowych najczęściej izolowanych w budynkach mieszkalnych należą *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum*), *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*), *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. herbarum*), *Alternaria* (*A. tenuis*, *A. alternata*), *Acremonium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* i inne (Flannigan, 2001a; Zyska, 2001a; Singh, 2001, Barabasz i Jaśkowska, 2001; Piontek, 2004). Grzyby z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus* otrzymały miano „grzybów pomieszczeń mieszkalnych” (Flannigan, 2001a). Wystę-

¹ www.enhis.net/object_document/04720n27384

powanie tych samych gatunków grzybów strzępkowych w powietrzu oraz na przegrodach budowlanych świadczy o możliwości rozprzestrzeniania się zarodników wewnątrz pomieszczeń (Piotrowska i in., 2001b).

Stopień zanieczyszczenia pleśniami powietrza wewnątrz porażonych budynków jest bardzo zróżnicowany, liczba jednostek tworzących kolonie kształtuje się w szerokim zakresie: od $1,2 \times 10^2$ jtk/m³ do $5,9 \times 10^5$ jtk/m³ (Hunter i in., 1988; Miller i in., 1988; Doleżał, 1992; Piotrowska i in., 2001b). Na przegrodach budowlanych pokrytych tynkami, powłokami malarskimi, tapetami, płytami kartonowo-gipsowymi, drewnem, stan zagrzybienia szacowany jest na poziomie od $1,8 \times 10^1$ jtk/100 cm² do $4,6 \times 10^8$ jtk/100 cm² (Doleżał, 1992; Piotrowska i in., 2001b). Z uwagi na brak norm dotyczących dopuszczalnego stężenia mikroorganizmów w powietrzu wewnątrz pomieszczeń i na przegrodach budowlanych, przyjmuje się kryteria przedstawiane w literaturze (Krzysztofik, 1992; Piotrowska i in., 2001a; Górny, 2004a; 2009). Dopuszczalne stężenie grzybów strzępkowych w powietrzu pomieszczeń mieszkalnych i użyteczności publicznej wynosi 5×10^3 jtk/m³, przy czym niedozwolona jest obecność patogenów (Górny, 2009), natomiast na przegrodach budowlanych liczba grzybów nie powinna przekraczać poziomu 1×10^4 jtk/100 cm² powierzchni (Piotrowska i in., 2001a).

Ocena zanieczyszczenia budynków obejmuje oznaczanie liczby i identyfikację grzybów strzępkowych na powierzchniach materiałów budowlanych oraz w powietrzu pomieszczeń. Badania takie wykonuje się zwykle metodami hodowlanymi lub chemicznymi, wśród których należy wymienić oznaczanie ergosterolu, związków lotnych, (1→3)-β-glukanu czy mikotoksyn (Gutarowska i Piotrowska, 2007). Najbardziej miarodajną metodą, która pozwala oznaczyć całkowitą ilość grzybni jest wykrywanie ergosterolu. W metodzie tej wykrywamy, obok elementów morfologicznych żywych, również nieaktywne, niezdolne do wzrostu. Obecnie metodę tę coraz częściej wykorzystuje się do analizy zagrzybienia materiałów budowlanych (Pasanen i in., 1999; Nielsen i Madsen, 2000; Gutarowska i Żakowska, 2002; Hippelein i Rügamer, 2004).

Na podstawie zawartości ergosterolu, korzystając z równań modelowych, można obliczyć ilość pleśni obecnych w materiale budowlanym wyrażoną w jtk/100 cm², jak również masę grzybni (g) (Gutarowska i Żakowska, 2002, 2009). Mierząc zawartość ergosterolu podczas hodowli pleśni na materiale budowlanym, można oszacować również szybkość wzrostu oraz porównać poziom zanieczyszczenia grzybami z zaproponowanym w literaturze limitem (4 mg/100 cm²), wskazującym na porażenie powierzchni materiału budowlanego (Gutarowska i Żakowska, 2002). Zawartość ergosterolu w materiale budowlanym może dodatkowo dostarczyć informacji, czy materiał w przeszłości ulegał zagrzybieniu, co świadczy o jego jakości.

Głównym źródłem grzybów strzępkowych w budynkach jest powietrze atmosferyczne (Lis i in., 1997; Mędreła-Kuder, 2000; Piotrowska i in., 2001b). Liczba grzybów w powietrzu atmosferycznym w okresie od maja do września jest wysoka, w pozostałych miesiącach znacznie spada i osiąga minimum w zimie. Grzyby w budynku mogą również pochodzić z porażonych materiałów budowlanych i wykończeniowych. Niewłaściwie przechowywane materiały budowlane, bez zabezpieczenia przed czynnikami atmosferycznymi, mogą łatwo ulegać porażeniom pleśniowym (Doleżał, 1989; Zyska, 2001b). Badania materiałów budowlanych (styropian, cement, żwir, drewno, cegły i inne) pobranych z fabryk wykazały koncentrację grzybów strzępkowych na poziomie wskazującym na aktywny ich rozwój (Doleżał, 1989). Materiały takie zastosowane w budownictwie lub pracach wykończeniowych mogą stać się źródłem grzybów w pomieszczeniu. Ponadto ważnym ich źródłem może być kurz domowy. Stwierdzono, iż liczba zarodników pleśni w kurzu może dochodzić do $3,2 \times 10^6$ jtk/g (Korpi i in., 1997). Szacuje się, iż zarodniki pleśni stanowią od 5% do 20% kurzu domowego (Lipiec, 1997). Według badań Millera i in. (1988), ponad połowa z wyizolowanych z kurzu domowego gatunków była obecna w powietrzu pomieszczeń.

1.4. Wpływ grzybów strzępkowych na zdrowie ludzi

Grzyby strzępkowe, rozwijając się na materiałach budowlanych, niszczą materię budowlaną, jak również są przyczyną zagrożeń zdrowotnych. Wśród tych zagrożeń najpoważniejsze są mikozy, alergię, mikotoksykozy, hemosyderoza płuc, SBS. Przyczyną chorób są fragmenty strzępek grzybni oraz obecne w powietrzu zagrzybionych pomieszczeń zarodniki, z którymi człowiek styka się na co dzień. Bardzo małe rozmiary zarodników (2-4 μm – rodzaje *Aspergillus*, *Penicillium*, 4-10 μm – rodzaje *Cladosporium*, *Ustilago*, >10 μm – rodzaje *Fusarium*, *Alternaria*) pozwalają penetrować głęboko do drzewa oskrzelowego i płuc (Grajewski i Twarużek, 2004). Zarodniki oraz fragmenty grzybni mają na swojej powierzchni aktywne biologicznie związki, takie jak (1 \rightarrow 3)- β -glukan, białka alergenne i mikotoksyny, które są niebezpieczne dla zdrowia mieszkańców. W powietrzu pomieszczeń występują również liczne fragmenty strzępek grzybni o wielkości mniejszej niż 1 μm (Górny i in., 2002b; Brasel i in., 2005; Seo i in., 2007). Częstki te nie są mierzalne metodami stosowanymi powszechnie w analizie mikrobiologicznej powietrza. Uważa się, iż wykrywamy zaledwie 6-20% cząstek grzybów obecnych w powietrzu (Górny, 2009).

Zarodniki oraz fragmenty strzępek grzybów występują w całym otaczającym nas środowisku – w powietrzu atmosferycznym, wewnątrz budynków, na skórze i włosach człowieka. Nie stanowią zagrożenia dla zdrowia, jeśli ich liczba jest

niewielka oraz nie należą do gatunków patogennych. Organizm ludzki wyposażony jest w mechanizmy obronne, które chronią go przed wnikaniem komórek wegetatywnych oraz zarodników pleśni. Przede wszystkim nabłonek oddechowy jest wyścielony rzęskami i śluzem. Duże formy morfologiczne skutecznie usuwane są dzięki ruchom rzęsek, sklejanu śluzem oraz odruchowi kaszlu. Mniejsze cząstki mogą wprawdzie wnikać do oskrzeli i płuc, ale tam skutecznie są eliminowane przez system obronny gospodarza. Znane są mechanizmy obrony przeciwgrzybowej, wśród których należy wymienić działanie lizozymu, laktoferyny i laktoperoksydazy oraz fagocytozę, działanie dopełniacza, i w dalszej odpowiedzi tworzenie przeciwciał (Baran, 1998). Jednak przy wysokim i długotrwałym zanieczyszczeniu powietrza bariera obronna może ulec zachwianiu, a system odpornościowy osłabieniu, co może prowadzić do rozwoju choroby.

Grzyby strzępkowe patogenne oraz liczne oportunistyczne mogą być przyczyną infekcji – mikozy, szczególnie u osób z obniżoną odpornością. Mogą wywoływać grzybice powierzchniowe skóry, włosów, paznokci i błon śluzowych oraz grzybice wewnętrzne, rozwijające się w różnych narządach, np. płucach, żołądku, przełyku, oku, uchu (Baran, 1998; Dzierżanowska, 2006). Grzyby patogenne z rodzajów *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum* wykazują silne właściwości keratynolityczne i są przyczyną zakażeń powierzchniowych skóry i paznokci. Większość zakażeń wewnętrznych wywołanych przez grzyby strzępkowe to aspergilozy, mukormikozy, rzadziej hialohyfomikozy oraz penicylozy (Baran, 1998; Dynowska, 2006). Najbardziej znane są aspergilozy płuc, zatok, rogówki oka, powodowane przez *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* (Midgley i in., 1997; Baran, 1998; Denning, 2006). Opisywane są również grzybice skóry i błon śluzowych oraz wewnętrzne, wywołane przez stale obecne w powietrzu saprofityczne pleśnie z rodzajów *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Alternaria* (Okudaira i in., 1977; Mullins i Seaton, 1978; Flannigan i Miller, 1994; Bellmann i in., 2008). Obecnie liczba grzybic znacznie zwiększyła się. Według lekarzy – wszystkie grzyby saprofityczne mające zdolność rozwoju w temperaturze ciała człowieka i przeżywania w ludzkich tkankach powinny być brane pod uwagę jako czynniki chorobotwórcze (Richardson i Warnock, 1995; Dynowska, 2006).

W 1996 r. stowarzyszenie European Confederation of Medical Mycology podzieliło grzyby strzępkowe, ze względu na zagrożenie zdrowotne, na 3 klasy bezpieczeństwa dla człowieka i zwierząt, tzw. BSL. Klasyfikacja została dokonana na podstawie potencjalnego zagrożenia możliwością wywołania infekcji, alergii oraz toksynotwórczości poszczególnych gatunków. Mikolodzy chętnie posługują się tą klasyfikacją przy analizach mikologicznych; służy ona do ustalenia jak bardzo dany gatunek może być groźny dla mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń.

Często w budynkach mieszkalnych obecne są grzyby o średnim i niskim zagrożeniu zdrowotnym, należące do klas BSL1 i BSL2 (Zyska, 2001a; Piontek, 2004). Należy jednak stwierdzić, iż klasyfikacja BSL nie obejmuje wielu bardzo groźnych gatunków, takich jak np. *Stachybotrys chartarum* oraz nie uwzględnia analizy toksyczności i alergenicności gatunków w środowisku budowlanym.

Wysokie zanieczyszczenie pleśniami powietrza wewnątrz budynków może również przyczyniać się do zapalenia płuc i oskrzeli. Schorzenia takie obserwuje się u pracowników przebywających w miejscach pracy w warunkach długotrwałego narażenia na wysokie stężenia zarodników pleśni w powietrzu, np. w zapleśniałych budynkach rolniczych, w sortowni orzeszków ziemnych porażonych przez pleśnię (Flannigan, 2001b; Bush i in., 2006; Chapman, 2006). W literaturze opisywano również przypadki tzw. hemosyderozy płuc (IPH) po długotrwałej ekspozycji na pleśń *Stachybotrys chartarum* (Dearborn i in., 1994; 1997). Choroba ta, obok typowych objawów alergii, charakteryzuje się hemolizą krwi, obecnością hemoglobiny w moczu oraz pękaniem naczyń krwionośnych płuc. Przyczyną zmian chorobowych jest zarówno obecność *S. chartarum* w płucach, jak również oddziaływanie mikotoksyn z grupy makrocyclicznych trichotecenów, wytworzonych przez te pleśnie. Opisano kilkanaście przypadków hemosyderozy w USA oraz w innych krajach; kilka z tych przypadków było śmiertelnych (Dearborn i in., 1994; 1997; Elidemir i in., 1999; Flappan i in., 1999; Novotny i Dixit, 2000).

Jednym z głównych zagrożeń zdrowotnych spowodowanych obecnością grzybów strzępkowych w budynkach mieszkalnych jest ich zdolność do wywołania alergii. Grzyby pleśniowe są trzecim pod względem częstotliwości alergenem człowieka, po alergenach pyłków traw i kurzu (Arshold i in., 2003). Alergia na pleśnie dotyczy od 3% do 40% populacji ludzkiej i kształtuje się na różnym poziomie w zależności od kraju, regionu, płci, wieku i innych czynników. Szacuje się, iż średnio około 6% ludzi jest uczulonych na grzyby strzępkowe (Bush i in., 2006). Alergia na grzyby często współistnieje z innymi alergiami, np. na pyłki traw czy roztocza, ze względu na to, iż cząstki te niosą na swojej powierzchni zarodniki grzybów. Zarówno fragmenty grzybni, jak również spory wykazują właściwości alergenne. W badaniach wykazano większą reaktywność fragmentów grzybni niż zarodników pleśni (Aukrust i in., 1985; Fadel i in., 1986; 1992; Górny, 2004b).

Masa cząsteczkowa większości alergenów grzybów wynosi od 10 kDa do 80 kDa, choć istnieją również alergeny o dużych masach cząsteczkowych, np. alergen *Aspergillus niger* Asp n 25 (100 kDa). Alergeny grzybów strzępkowych stanowią mieszaninę białek, glikoprotein i cukrów. Zlokalizowano je głównie w ścianie komórkowej, błonie cytoplazmatycznej oraz cytoplazmie (Platt i in., 1989; Kurup i in., 2000b; Górny, 2004b).

W organizmie człowieka wywołują odpowiedź immunologiczną poprzez działanie cytotoksyczne, wytwarzanie mediatorów reakcji zapalnych, takich jak TNF, IL-6 i innych (Reijula i in., 1991; Reponen i in., 2002; Górny, 2004b).

W ostatnich dwudziestu latach scharakteryzowano około 150 alergenów produkowanych przez 80 gatunków pleśni – pod względem masy cząsteczkowej, budowy chemicznej, funkcji biologicznej oraz reaktywności immunologicznej, potwierdzonej w testach *in vivo* (Simon-Nobbe i in., 2008). Wśród tych alergenów, 70 jest obecnie sklasyfikowanych przez International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee (IUISA). Przykłady sklasyfikowanych alergenów, na które mogą być narażeni mieszkańcy budynków mieszkalnych przedstawiono w tabeli 2. Lista ta obejmuje alergeny *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarium*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. brevicompactum*, *P. oxalicum* i inne.

Od kilku lat prowadzi się intensywne badania nad charakterystyką nowych alergenów pleśni (Shen i in., 2003; Schwabb i in., 2004; Tang i in., 2005), w tym również często występujących w budynkach mieszkalnych, np. *Aspergillus versicolor* (Benndorf i in., 2008) oraz *Stachybotrys chartarum* (Barnes i in., 2002; Kärkkäinen i in., 2004). Badanie alergenów odbywa się w określonych modelowych warunkach, a ich wytwarzanie na podłożach mikrobiologicznych o ustalonym składzie.

Alergie na grzyby strzępkowe rozwijają się na skutek ekspozycji zarówno na grzyby obecne wewnątrz budynków, jak również w powietrzu atmosferycznym. Alergolodzy dzielą grzyby na wewnątrz- i zewnątrzdomowe, w zależności od środowiska ich występowania (Lipiec, 2001). Alergie na grzyby wewnątrzdomowe, w przeciwieństwie do sezonowych alergii zewnątrzdomowych, nie są zależne od pory roku. Wiadomo jednak, iż zdolność do przenikania grzybów w obu środowiskach i występowania tych samych gatunków zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz budynków jest zjawiskiem opisywanym w literaturze (Lis i in., 1997; Mędreła-Kuder, 2000; Piotrowska i in., 2001b).

Opisano zdolność do wywołania reakcji immunologicznych przez grzyby należące do rodzajów *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i inne (Kurup i in., 2002; Chapman, 2006). Polskie badania epidemiologiczne wykazały, iż najczęściej uczulające są grzyby z rodzajów *Alternaria*, *Cladosporium*, w następnej kolejności *Penicillium* i *Aspergillus*; rzadziej uczulają grzyby *Mucor*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Pullularia*, *Curvularia*, *Phoma* i *Rhizopus* (Lipiec, 2000). Schata i wsp. (1989) sporządzili listę najczęściej alergizujących grzybów strzępkowych na podstawie badań 150 mieszkańców zagrzybionych budynków. Wśród nich kolejno występowały gatunki: *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium brevicompactum*,

Penicillium glabrum, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* (*A. tenuis*) i inne.

Tabela 2. Wybrane alergeny pleśni, na które mogą być narażeni mieszkańcy budynków mieszkalnych (na podstawie IUISA oraz Kurup i in., 2002a; 2002b)

Pleśń/ Alergen	Masa cząsteczkowa (kDa)	Biochemiczna nazwa
<i>Alternaria alternata</i>		
Alt a 1	28	– nie oznaczona
Alt a 4	57	Izomeraza disiarczkowa
Alt a 5	45	Enolaza
Alt a 6	11	Białko kwaśne rybosomalne P2
Alt a 10	53	Dehydrogenaza aldehydowa
<i>Cladosporium herbarium</i>		
Cla h 3	53	Dehydrogenaza aldehydowa
Cla h 4	11	Białko kwaśne rybosomalne P2
Cla h 6	46	Enolaza
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
Cla c 9	36	Wakuolarna proteaza serynowa
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
Asp f 1	18	Rybonukleaza
Asp f 3	19	Białko peroksysomalne
Asp f 5	40	Metaloproteinaza
Asp f 8	11	Białko rybosomalne P2
<i>Aspergillus flavus</i>		
Asp fl 13	34	Alkaliczna proteaza serynowa
<i>Aspergillus niger</i>		
Asp n 14	105	Beta – ksylozydaza
Asp n 18	34	Wakuolarna proteaza serynowa
Asp n 25	66-100	3-fytaza B
<i>Penicillium chrysogenum</i>		
Pen ch 13	34	Alkaliczna proteaza serynowa
Pen ch 18	32	Wakuolarna proteaza serynowa
Pen ch 20	68	N-acetyloglukozaminidaza
<i>Penicillium brevicompactum</i>		
Pen b 13	33	Alkaliczna proteaza serynowa
Pen b 26	11	Białko kwaśne rybosomalne P1

Stwierdzono, iż poszczególne gatunki grzybów mogą wywołać reakcje alergiczne ujawniające się w górnym i dolnym odcinku układu oddechowego. Jest to zależne od rozmiarów zarodników pleśni wywołujących reakcję alergiczną (Jussila i in., 2002; Grajewski i Twarużek, 2004).

Alergia na grzyby strzępkowe może przybierać różne postacie dolegliwości określane jako alergia wziewna, odczyny zapalne błon śluzowych nosa, gardła, nadreaktywność oskrzeli, astma oskrzelowa, alergia kontaktowa, pokarmowa, alergiczne zapalenie płuc (Lipiec, 2001). Możliwość wywołania astmy oskrzelowej przez grzyby strzępkowe obecne w budynkach potwierdzili w swoich badaniach Burr i in. (1988) oraz Garcia i in. (1995).

Simmon-Nobbe i in. (2008) wykazali, iż u 80% pacjentów z astmą występowała nadwrażliwość alergiczną na pleśnie *Alternaria* i *Cladosporium*. Badania prowadzone w Polsce przez Niedożytko i in. (2004) na pacjentach z astmą wykazały pozytywną reakcję na alergeny tych grzybów u 99% badanych. Nieliczne są natomiast badania dotyczące alergii na grzyby z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*. Mukherjee i Moudgil (2006) podają, że 25% pacjentów z astmą wykazuje alergię na grzyby *Aspergillus*. Inne choroby alergiczne, których podłożem były grzyby strzępkowe obecne w budynkach, opisywane były przez Samson i in. (1994), Larssen i Frisvad (1994), Peat i in. (1998), Kurup i in. (2000a) oraz Meklin i in. (2002). Często reakcjom alergicznym towarzyszą infekcje, które pojawiają się, gdy bariera immunologiczna zostanie przerwana (Reijula i in., 1991). U pacjentów z astmą oskrzelową może wystąpić kolonizacja przez grzyby saprofityczne, np. z rodzaju *Aspergillus* i w konsekwencji objawy grzybicy płuc (ABPA) (Bogacka, 2004).

Te wszystkie badania dotyczące identyfikacji alergenów grzybów strzępkowych wykonywano w warunkach hodowli laboratoryjnych na ściśle określonych pożywkach. Nie jest to równoznaczne ze zdolnością tworzenia alergenów przez grzyby strzępkowe na materiałach budowlanych w środowisku mieszkaniowym.

1.5. Mikotoksyny

Mikotoksyny to toksyczne związki organiczne o masie cząsteczkowej od 200 Da do 800 Da, wytwarzane przez grzyby strzępkowe należące do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* i innych. Wszystkie mikotoksyny wykazują działanie toksyczne wobec człowieka, zwierząt, roślin i mikroorganizmów; szkodliwe działanie tych związków pojawia się już przy niewielkich stężeniach, na poziomie 1 mg/kg (ppm) lub nawet niższych (ppb) (Chełkowski, 2010). Znanych jest ponad 400 mikotoksyn i 350 gatunków grzybów producentów, a liczba nowo odkrytych stale rośnie. Obecnie wiele uwagi poświęca się mikotoksynom

wytwarzanym przez grzyby z rodzajów *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Paecilomyces* (Nielsen i in., 1999; Tuomi i in., 2000; Flannigan, 2001b). Mikotoksyny należą do różnych grup chemicznych; są wśród nich pochodne kumaryny (aflatoksyny, ochratoksyny), wielocykliczne laktony (zearalenon, patulina), pochodne trichotecenów (toksyna T-2, DON, NIV, satratoksyna) i wiele innych grup. Mikotoksyny są wtórnymi metabolitami grzybów, wytwarzanymi zarówno w początkowej fazie wzrostu wegetatywnego (np. ochratoksyna A, aflatoksyny), jak również w fazie stacjonarnej (większość mikotoksyn). Nie są niezbędne do życia wytwarzającego go grzyba (Piotowska i Żakowska, 2008; Chełkowski, 2010). Mikotoksyny charakteryzuje wysoka stabilność w warunkach działania promieni UV, wysokiej temperatury oraz związków chemicznych, które oddziałują hamująco lub bójczo na wzrost grzybów (Tuomi i in., 2000).

Wciąż nie do końca poznano znaczenie tych związków dla ich producentów. Sugeruje się, iż wytwarzanie mikotoksyn umożliwia rozprzestrzenianie się producentów poprzez hamowanie wzrostu konkurencyjnych mikroorganizmów, obecnych we wspólnie zasiedlanym środowisku. Potwierdzono zdolność hamowania wzrostu bakterii oraz innych niż producent gatunków grzybów przez grzyby toksynotwórcze (Boutibonnes, 1980; Chełkowski, 1985; 2010). Jednocześnie obecność niektórych rodzajów drobnoustrojów może ograniczać lub nawet hamować wytwarzanie mikotoksyn (Chełkowski, 1985; 2010; Piotrowska i Żakowska, 2001a). Inna teoria wyjaśniająca rolę mikotoksyn dla producentów wskazuje, iż wytwarzanie tych związków może być wynikiem rozregulowania przemiany materii, w wyniku czego dochodzi do nadprodukcji metabolitów pośrednich w komórce. Nadmiar tych związków może uruchamiać – dla zachowania równowagi biochemicznej – syntezę nietypowych produktów (Żakowska i Stobińska, 2000).

Podczas wzrostu grzyba, mikotoksyny są kumulowane w grzybni oraz zarodnikach, jak również część mikotoksyn może zostać wydalona do podłoża, na którym rośnie mikroorganizm. Na podłożach mikrobiologicznych największe ilości mikotoksyn gromadzone są w kroplach wydzieliny na powierzchni grzybni (3000 ppb OTA, czyli 3 µg/ml), mniejsze w formach morfologicznych – grzybni i zarodnikach (1000 ppb OTA, czyli 1 µg/g), najmniejsze w podłożu hodowlanym (50 ppb OTA, 5 µg/100 g) (Grajewski i Twarużek, 2004). Badania w łącznej biomase grzybów z podłożem wykazywały różne stężenie wykrywanych mikotoksyn, od 30 µg aflatoksyny/kg suchej biomasy do 48 000 µg sterigmatocystyny/kg suchej biomasy (Cvetinic i Pepeljnjak, 1997; Piontek, 2004). W materiałach budowlanych porażonych przez grzyby wykrywano mikotoksyny, takie jak sterigmatocystyna, 5-metoksysterigmatocystyna, satratoksyna, w stężeniach od 0,21 do 3100 µg/kg materiału lub 0,4 ng/cm² do 770 µg/cm² powierzchni materiału budowlanego (Nielsen i in., 1999; Tuomi i in., 2000). Badania zarodników

grzybów strzępkowych wykazały, iż stężenie mikotoksyn (aflatoksyny, sterigmatocystyna, DON, T-2, fumonizyna, cytrynina, roquefortyna, satratoksyna) wynosi od 1 do 650 µg toksyny/g suchej masy zarodników (Flannigan i in., 1991). Obliczenia wykonane na przykładzie zarodników *Aspergillus versicolor* dostarczyły informacji o stężeniu sterigmatocystyny (ST) obecnej w jednym zarodniku (0,375 – 1,06 pg ST/spore) (Flannigan i in., 2001b). Na podstawie tych obliczeń można prognozować, jak dużo tej toksycznej substancji może wdychać człowiek narażony na obecność zarodników *A. versicolor* w powietrzu zagrzybionego pomieszczenia. Przy zanieczyszczeniu powietrza na poziomie 10^3 jtk/m³ i założeniu, że wszystkie jednostki tworzące kolonie są zarodnikami *A. versicolor* zanieczyszczonymi dużą ilością sterigmatocystyny, stężenie tej mikotoksyny obecnej w powietrzu wynosi 1 ng/m³. Człowiek, wdychając średnio 11 m³ powietrza/dobę, może maksymalnie wchłonać 11 ng ST w ciągu jednego dnia.

Na wydajność tworzonych mikotoksyn ma wpływ wiele czynników, takich jak skład chemiczny podłoża, obecność niektórych mikroelementów, temperatura, wilgotność środowiska oraz wspomniana obecność mikroorganizmów towarzyszących. Produkcja mikotoksyn jest właściwością szczepową; w obrębie jednego gatunku mogą występować ponad 1000-krotne różnice w ilościach mikotoksyn wytwarzanych przez różne szczepy (Chełkowski, 1985). Zdarzają się również szczepy, które utraciły zdolność wytwarzania mikotoksyny, np. wykazano, iż tylko 35% izolatów *Stachybotrys chartarum* wytwarza satratoksynę (Jarvis i Nielsen, 2000). Z kolei wiele szczepów pleśni jest zdolnych do produkcji mikotoksyn tylko w określonych warunkach laboratoryjnych (Buchmiet i Żakowska, 2009). Wstępne badania porażonych grzybami przegród budowlanych w budynkach mieszkalnych na terenie Łodzi wykazały brak toksyczności wymazów z tynków, powłok, ścian, materiałów budowlanych i wykończeniowych, jednak niektóre gatunki grzybów wyizolowanych z tych środowisk po przeniesieniu na podłoża mikrobiologiczne (YES, MEA) rozpoczęły produkcję mikotoksyn (Gutarowska i in., 2005); tę właściwość potwierdzono u 17% izolatów.

Czy zanik toksynotwórczości obserwowany u grzybów strzępkowych w warunkach mieszkaniowych jest zjawiskiem trwałym? Jakie czynniki wpływają na stymulację produkcji mikotoksyn na materiałach budowlanych? – pozostają problemami do wyjaśnienia.

Wytwarzanie mikotoksyn w zagrzybionych budynkach mieszkalnych, choć wskazywane przez wielu autorów, jest nadal mało poznane. W tabeli 3 przedstawiono przykłady toksynotwórczych grzybów strzępkowych wyizolowanych z próbek pobranych w budynkach mieszkalnych oraz wytwarzane przez nie mikotoksyny.

Tabela 3. Gatunki toksynotwórczych grzybów strzępkowych oraz mikotoksyny wykrywane w budynkach mieszkalnych

Grzyb strzępkowy	Mikotoksyny	Autorzy, rok
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Trichoteceny: trichowerrol, werrukarol, roridyna, isororidyna, trichowerryryny, werrukaryna, satratoksyny, isosatratoksyny	Jarvis i in., 1995; Nielsen i in., 1999; Andersson i in., 1997; Gravesen i in., 1999
	Fenylowe spirodrimony: benzolaktony, benzolaktamy, benzodialdehydy, stachybocyny	Jarvis i in., 1995; Nakamura i in., 1995; Ogawa i in., 1995; Roggo i in., 1996
	Cykliczne peptydy: cyklosporyny	Sakamoto i in., 1993
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocystyna, 5-metoksysterigmatocystyna	Nielsen i in., 1999; Gravesen i in., 1999; Flannigan, 2001b
<i>Aspergillus niger</i>	Malforminy, aspergilina, pyrofen, flawininy i inne	Nielsen i in., 1999; Gravesen i in., 1999; Flannigan, 2001b
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Roquefortyna C, meleagrina, kwas penicylinowy i inne	Nielsen i in., 1999; Flannigan, 2001b
<i>Penicillium expansum</i>	Cytrynina, patulina, roquefortyna C i inne	Nielsen i in., 1999; Flannigan, 2001b
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Werrukozydyna, werrukofortyna	Gravesen i in., 1999
<i>Alternaria</i> spp	Alternariol, alternariol-monometylowy eter	Gravesen i in., 1999
<i>Chaetomium</i> spp	Chetoglobozyna	Gravesen i in., 1999

Mikotoksyny oznacza się różnymi metodami. Najczęściej wykorzystuje się metody chromatograficzne, takie jak TLC (chromatografia cienkowarstwowa), HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa) oraz metodę immunoenzymatyczną Elisa (Czerwiecki, 2000). W materiałach budowlanych toksyczne związki pochodzące od grzybów oznacza się metodą HPLC z zastosowaniem różnych detektorów, np. HPLC-UV/VIS (Nielsen i in., 1999), HPLC-DAD (Frisvad i in. 1987), HPLC-MS (Tuomi i in., 1998), HPLC-MS/MS (Sulyok i in., 2007). Uznaje się, iż metoda HPLC-MS/MS jest najbardziej czułą metodą wykrywania mikotoksyn w środowisku (Sulyok i in., 2009; Vishwanath i in., 2009a, 2009b). Wszystkie przedstawione techniki analityczne, pozwalające na wykrywanie

mikotoksyn, charakteryzują się większą (metoda immunoenzymatyczna Elisa) lub mniejszą (HPLC) specyficznością wykrywania. W metodach chromatograficznych możemy wykryć tylko związki toksyczne o znanej strukturze chemicznej.

Przez analogię do wykrywalności grzybów w powietrzu (6-20% grzybów jesteśmy w stanie wykryć obecnymi metodami – Górny, 2009) wydaje się, iż zidentyfikowano do tej pory nieliczne mikotoksyny w środowisku budowlanym. Na obecnym poziomie wiedzy zagadką pozostaje nadal mechanizm wytwarzania oraz aktywność biologiczna wielu nieznanymi mikotoksyn.

1.5.1. Wpływ mikotoksyn na zdrowie mieszkańców

Mikotoksyny wywołują schorzenia zwane mikotoksykozami. Mogą one mieć charakter ostry, ale częstsze i znacznie groźniejsze w skutkach są mikotoksykozy przewlekłe, będące wynikiem przyjmowania małych dawek toksyn przez długi okres czasu. Biorąc pod uwagę fakt długotrwałego przebywania ludzi w budynkach mieszkalnych (ponad 80% doby) oraz potwierdzonej obecności mikotoksyn w zarodnikach, człowiek może być narażony na mikotoksykozy przewlekłe. W latach 70. zwrócił na to uwagę profesor Julian Aleksandrowicz, wskazując po raz pierwszy na rolę mikotoksyn w rozwoju chorób nowotworowych. W swoich badaniach wykazał, iż w mieszkaniach osób chorych na raka krwi bardzo często izolowany był gatunek *Aspergillus flavus*, który jest znanym producentem aflatoksyn. Ponadto w surowicach krwi mieszkańców wykryto wysoki poziom przeciwciał wobec *A. flavus* (Aleksandrowicz i Smyk, 1970; 1973). Analogiczne badania mieszkańców budynków zagrzybionych innymi gatunkami grzybów strzępkowych przeprowadziła Doleżał (1992). Mikotoksyny nie mają właściwości antygenowych ze względu na zbyt niską masę cząsteczkową, jednak długotrwała ekspozycja na pleśń toksynotwórcze może przyczyniać się do modulowania odpowiedzi immunologicznej – albo osłabienia zdolności obronnych organizmu, albo reakcji alergicznej i zapalnej.

W badaniach laboratoryjnych na zwierzętach potwierdzono możliwość zatrucia inhalacyjnego przez mikotoksyny obecne w zarodnikach *Stachybotrys chartarum* (trichoteceny) (Sorenson i in., 1987).

Mikotoksyny mogą łatwo wnikać wraz z zarodnikami do układu oddechowego i tam kumulować się lub wraz z krwią przenikać do innych organów. Mogą również podrażniać skórę albo też zanieczyszczać żywność i w ten sposób dostawać się do układu pokarmowego. Richard i wsp. (1999) potwierdzili występowanie ochratoksyny A w kurzu domowym (58-1500 ppb/1 g kurzu). W domu tym wystąpiły objawy zatrucia zwierząt. Wykazano, iż wdychanie zarodników z mikotoksynami jest znacznie groźniejsze niż ich spożywanie (Creasia i in., 1987).

Dzisiaj wiadomo, że spektrum oddziaływania biologicznego mikotoksyn jest bardzo szerokie. Obejmuje ono działanie genotoksyczne, mutagenne, teratogenne, rakotwórcze, estrogenne, cytotoksyczne (w tym neuro-, nefro-, hepato-, gastro-toksyczne) oraz immunosupresyjne i wiele innych niekorzystnych oddziaływań (Betina, 1989; Fink-Gremmels, 1999; Casteel i Rottinghaus, 2000; Pitt, 2000; Bennett i Klich, 2003; Chełkowski, 2010). Skutkiem działania mikotoksyn może być między innymi rak wątroby, nowotwory krwi, uszkodzenia nerek, spadek produkcji krwinek, zmniejszenie krzepliwości krwi, zaburzenia funkcji rozrodczych oraz wiele innych schorzeń, związanych z wpływem mikotoksyn na aparat genetyczny i immunologiczny (Doleżal, 1989; Kosińska, 1998; Barabasz i Jaśkowska 2001; Flannigan, 2001b; Grajewski, 2006). Jednocześnie bardzo trudno w warunkach mieszkań udowodnić, iż dana mikotoksyna jest odpowiedzialna za rozwój konkretnej choroby. Mnogość różnych czynników wpływających na zdrowie mieszkańców oraz różna kondycja immunologiczna poszczególnych osób powodują, iż trudno jest w sposób jednoznaczny łączyć daną mikotoksynę z określonymi objawami chorobowymi.

Badania mikotoksyn w warunkach modelowych na materiałach budowlanych oraz związanych z tym zagrożeń zdrowotnych są nadal mało poznana dziedziną wiedzy. Szczepy wielu pleśni zdolne są do wytwarzania zwykle kilku mikotoksyn. Obok tych związków produkują również inne metabolity, które mogą wykazywać toksyczne działanie synergistyczne lub znosić/maskować biologiczne oddziaływanie mikotoksyn. Nieznane są skutki narażenia na mieszaniny mikotoksyn oraz innych substancji szkodliwych, występujących we wdychanym powietrzu wewnątrz pomieszczeń (Amman, 2006). Obok wykrywania mikotoksyn, w analizie zagrożeń powinno się wykonywać badania ogólnej cytotoksyczności i genotoksyczności ekstraktów grzybów porażających materiały budowlane.

1.5.2. Cytotoksyczność mikotoksyn

Cytotoksyczność obejmuje działanie toksyczne na komórki poszczególnych układów, np. rozrodczego, krwionośnego, moczowego, nerwowego, pokarmowego, oddechowego, w kierunku których mikotoksyny wykazują powinowactwo. Działanie cytotoksyczne potwierdzono w badaniach modelowych na czystych mikotoksynach, takich jak: roridyna, trichowerrol, satratoksyna, T-2, DAS, NIV, DON, PAT, OTA, AFL B1 i innych. Wykazano wysoką cytotoksyczność mikotoksyn wobec różnych linii komórkowych komórek nerek świń, ludzkich komórek nabłonka płuc, nabłonka serca, limfocytów, fibroblastów mysich, komórek HeLa i innych (Chełkowski, 1985; Lewis i in., 1999; Johanning i in., 1999; Okumara i in., 2000; Gareis, 2002). Szczególnie wysoką cytotoksyczność wykazuje roridyna wobec

komórek nerek świń (Tabela 4); toksyna ta wytwarzana jest przez grzyby z rodzaju *Myrothecium* i *Stachybotrys*.

Tabela 4. Cytotoksyczność mikotoksyn (oznaczenia w teście MTT na komórkach nerek świń) (Grajewski i Twarużek, 2004)

Mikotoksyna	Cytotoksyczność IC50 (µg/ml)
Roridyna	0,000013
Aflatoksyna B1 (AFL B ₁)	5,00
Ochratoksyna A (OTA)	6,31
Niwalenol (NIV)	8,26
Deoksyniwalenol (DON)	16,36
Trichotecena DOM-1*	>100,80

*DOM -1 – 3α,7α,15-trihydroksytrichoteceno-9,12-dien-8-on

Badania cytotoksyczności materiałów pobranych z budynków mieszkalnych są nieliczne. Miller i wsp. (1988) wykazali cytotoksyczność wobec komórek HeLa w 3 próbkach na 70 badanych próbek pobranych z zagrzybionych mieszkań. Cytotoksyczność dotyczyła próbek powietrza i wynosiła 3 µg/ml ekstraktu. W badaniach wykonanych na terenie Polski, Twarużek i wsp. (2004) stwierdzili, iż wymazy ze ścian zagrzybionych budynków zawierające roridynę charakteryzowały się wysoką cytotoksycznością wobec komórek nerek świni. Badania cytotoksyczności grzybów *Stachybotrys chartarum* oraz *Memoniella echinata* pochodzących z budynków mieszkalnych wykazały, iż gatunki wytwarzające satratoksynę, trichowerrol oraz roridynę były toksyczne dla komórek nabłonka płuc w stężeniu 100 µg/ml (Jarvis i in., 1998).

Badanie cytotoksyczności metabolitów wytwarzanych przez pleśnie na materiałach budowlanych wydaje się postępowaniem najbardziej słusznym w ocenie narażenia zdrowotnego mieszkańców zagrzybionych budynków. Cytotoksyczność określa się najczęściej za pomocą kultur komórkowych metodami MTT oraz XTT (Hanelt i in., 1994; Goodwin i in., 1995; Lewis i in., 1999). W testach tych określa się żywotność komórek w hodowlach *in vitro*, na podstawie aktywności dehydrogenaz mitochondriów, które przekształcają substraty reakcji (MTT lub XTT) w barwne produkty (formazony). Zawartość barwnika w próbach oznacza się kolorymetrycznie. Na podstawie absorbancji hodowli komórek testowych i kontrolnych (bez toksycznej substancji) określa się żywotność komórek. Wyniki podaje się jako IC50 (stężenie substancji, które o 50% hamuje proliferację komórek, w porównaniu z kontrolą) lub w skali od (–) do (+++) (od braku do wysokiej cytotoksyczności) (Jarvis i in., 1998; Widestrand i in., 1999; Twarużek i in., 2004).

Toksyczność grzybów oznacza się również na organizmach żywych, wykorzystując do tego celu skorupiaki, wyplawki bądź mikroorganizmy, np. drożdże lub bakterie. Propozycję wykorzystania wyplawki *Dugesia tigrina* oraz bakterii *Vibrio fischeri* do badania toksyczności wymazów ze ścian przedstawiła Piontek (2004). Wykazała wysoką toksyczność grzybów strzępkowych wobec tych bioindykatorów i zaproponowała jako kryterium toksyczności zapleśniałych ścian tzw. toksyczną powierzchnię zapleśnienia (TPZ), określaną na podstawie przeliczenia wyników z biotestów na wielkość powierzchni zapleśniałych ścian.

1.5.3. Genotoksyczność mikotoksyn

Genotoksyczność oznacza zdolność do indukowania uszkodzeń DNA bezpośrednio przez dany związek chemiczny lub jego aktywny metabolit. Genotoksyczność niekoniecznie musi być związana z działaniem mutagennym. Związek chemiczny jest mutagenny, jeśli wywołuje mutacje, czyli trwałe zmiany w DNA. Związek – zarówno genotoksyczny jak i mutagenny – może indukować powstanie nowotworów (Vanparys i in., 1995). Działanie genotoksyczne mikotoksyn polega na zaburzeniach w procesie transkrypcji, co prowadzi do zmian w tworzeniu organów (działanie teratogenne) oraz indukuje procesy nowotworowe.

Badania wykonywane na mikotoksynach oraz ekstraktach z grzybów strzępkowych porażających produkty żywnościowe wykazały genotoksyczność wielu mikotoksyn, np. aflatoksyn B1, B2, G1, G2, sterigmatocystyny, patuliny, cytryniny, alternariolu, kwasu penicilinowego, toksyny T-2, zearalenonu, zearalenolu, ochratoksyny A, wersikoloryny A i innych (Krivobole i in., 1987; Sabater-Vilar i in., 2003; Casteel i in., 2009; Bächler i in., 2009). Wstępne badania w budynkach mieszkalnych wykazały brak genotoksyczności wymazów ze ścian pomieszczeń zagrzybionych wobec komórek chłoniaka myszy (Arkusz i in., 2007).

Ocenę genotoksyczności prowadzi się różnymi metodami *in vitro* na komórkach mikroorganizmów *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz na komórkach ssaków, takich jak komórki chłoniaka myszy, ludzkie limfocyty, erytrocyty, fibroblasty, komórki wątroby. Do oceny genotoksyczności zalecany jest test mutacji genu kinazy tymidynowej (TK) na mysich komórkach chłoniaka (MLA) (Dyrektywa 67/548/EWG, Gatehouse, 2002). Test polega na ocenie liczby komórek, w których zaszła mutacja TK+/- → TK-/- . Komórki takie nie produkują aktywnego enzymu TK i są odporne na cytotoksyczne działanie analogu pirymidyny – trifluorotymidyny (TFT), natomiast komórki ze sprawnym genem TK są wrażliwe na TFT, który powoduje zahamowanie metabolizmu komórkowego i podziałów. Stąd mutanty są zdolne do proliferacji w obecności TFT, zaś normalne komórki zawierające enzym TK nie namnażają się.

Związek uznaje się za genotoksyczny, jeżeli (Vanparys i in., 1995):

1. częstość zmian genetycznych (mutacji) dla przynajmniej jednego stężenia badanej substancji jest statystycznie większa niż częstość takich zmian w kontroli ujemnej (bez czynnika genotoksycznego);
2. istnieje zależność częstości mutacji od stężenia substancji.

1.6. Inne substancje aktywne biologicznie wytwarzane przez grzyby strzępkowe

Obok alergenów i mikotoksyn, również inne substancje aktywne biologicznie mają istotny wpływ na zdrowie ludzi przebywających w zagrzybionych pomieszczeniach. Jedną z takich substancji jest $(1\rightarrow3)$ - β -glukan, który pobudza układ immunologiczny do stałej aktywności (Rao i in., 2004; Iossifova i in., 2007), analogicznie jak bakteryjna endotoksyna (McGinnis, 2004; Douwes i in., 1997). Ten zewnątrzkomórkowy polisacharyd obecny w ścianie komórkowej wykrywany był zarówno w kurzu (Chew, 2001; Iossifova i in., 2008), jak również w powietrzu i na materiałach budowlanych (Seo i in., 2008; 2009). Inhalacja $(1\rightarrow3)$ - β -glukanu wywołuje objawy ze strony górnych dróg oddechowych, jak również indukuje tworzenie cytokin i monocytów, wywołując astmę i alergię (Rylander i Lin, 2000).

Znany syndrom SBS jest związany z wysokim stężeniem $(1\rightarrow3)$ - β -glukanu w powietrzu oraz obecnością innych czynników biologicznie aktywnych, wytwarzanych przez pleśnie (Cooley i in., 1998; Lehtomäki i in., 1999; Behrendt i Lemmen, 2002). Zespół Chorego Budynku obejmuje liczne objawy, takie jak katar, kaszel, objawy ze strony błon śluzowych oczu, nosa, gardła, bóle głowy, zaburzenia pamięci, snu, wysypki skórne, objawy podobne do astmy (Żakowska i in., 2004; Singh, 2005; Chapman, 2006). Cechą charakterystyczną SBS jest fakt, iż objawy chorobowe zanikają, kiedy człowiek opuszcza na dłużej pomieszczenie, w którym dochodzi do ekspozycji na grzyby.

Na zdrowie mieszkańców również wpływają organiczne związki lotne MVOCs, wytwarzane przez grzyby strzępkowe w budynkach. MVOCs obejmują różnorodne związki chemiczne, np. alkohole, aldehydy, ketony, aminy, terpeny, związki siarki, węglowodory chlorowane (Kamiński i in., 1974; Börjesson i in., 1990; 1993; Larssen i Frisvad, 1994). Potwierdzono toksyczność tych związków w testach cyto- i genotoksycznych (Fiedler i in., 2001; Kreja i Seidel 2002). Liczni autorzy wiążą również objawy SBS z obecnością związków lotnych w pomieszczeniach (Pasanen i in., 1998; Korpi i in., 1999; Singh, 2001). Wykazano ponadto istotny związek między wytwarzaniem MVOCs i niektórych mikotoksyn. Niektóre związki lotne mogą być prekursorami mikotoksyn, np. trichodieny mogą

być prekursorem trichotecenów, natomiast aristolocheny – toksyn PR (Jeleń, 2002). Wytwarzanie MVOCs zależy głównie od gatunku pleśni, aczkolwiek wiele związków jest wytwarzanych przez kilka gatunków, a nawet rodzajów grzybów (Wessen i Schoeps, 1996). Rodzaj wytwarzanego związku lotnego jest uzależniony od podłoża wzrostu grzyba. Wykazano istotne różnice w spektrum produkowanych związków lotnych podczas wzrostu pleśni na papierze, materiałach budowlanych oraz pożywkach mikrobiologicznych (Bjurman i Kristensson, 1992; Whillans i Lamont, 1995). Stwierdzono, iż materiały budowlane są dobrym podłożem do tworzenia MVOCs przez grzyby strzępkowe (Van Lancker i in., 2008).

1.7. Czynniki warunkujące wzrost grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych

Wzrost grzybów strzępkowych w budynkach zależy od wielu czynników, wśród których najważniejsze to wilgotność, temperatura, światło, pH, obecność składników budulcowych i związków mineralnych (Zyska, 1999; Pasanen i in., 2000; Nielsen i in., 2002; 2004). Temperatura panująca w pomieszczeniach (średnia temperatura powietrza wynosi 20 °C) jest optymalna do wzrostu grzybów (Grant i in., 1989; Singh, 1994). Niektóre gatunki z rodzaju *Penicillium* i *Cladosporium* są zdolne do wzrostu na drewnie nawet w niskich temperaturach, około 5 °C (Nielsen, 2002). Światło jest czynnikiem, który może wpływać na zarodnikowanie grzybów oraz szybkość ich wzrostu, a także syntezę niektórych składników chemicznych (Zyska, 1999). Zarówno nadmierne oświetlenie, jak i jego brak (piwnice, strychy) nie ograniczają wzrostu pleśni w budynkach. Również pH materiałów budowlanych nie stanowi bariery dla grzybów strzępkowych. Większość materiałów budowlanych ma odczyn lekko kwaśny (pH 5-7) (Zyska, 1999), natomiast pleśnie wykazują możliwość wzrostu w zakresie pH od 2 do 11, z optymalnym poziomem pH 5-6 (Żakowska i Stobińska, 2000). Niektóre materiały charakteryzują się wysokim pH, np. zaprawa budowlana (pH 10), jednak w warunkach dostępu do organicznego źródła węgla również i takie materiały mogą być zasiedlane przez grzyby strzępkowe.

Najważniejsze znaczenie dla rozwoju grzybów strzępkowych w budynkach ma podwyższona wilgotność materiałów budowlanych. Przyczyną tego zjawiska jest adsorpcja pary wodnej zawartej w powietrzu lub pochłanianie wody z innych źródeł (podsiąkanie kapilarne z gleby, awarie rynny i inne) oraz skraplanie pary wodnej na powierzchniach przegród budowlanych o obniżonej temperaturze.

Wilgoć w materiale budowlanym może występować jako woda związana chemicznie (np. hydraty w gipsie, zaprawie, betonie), woda związana fizykochemicznie (wilgoć sorpcyjna) oraz fizykomechanicznie (bezpośrednia styczność z wodą).

Sorpcja wilgoci (proces pochłaniania pary wodnej przez suchy materiał budowlany) ma duże znaczenie dla materiałów o silnie rozwiniętej powierzchni wewnętrznej. Wilgoć sorpcyjna materiału nie stwarza dużych problemów, nie rozpuszcza soli mineralnych, nie zmienia zasadniczo przewodności cieplnej, nie aktywuje rozwoju grzybów strzępkowych (Pogorzelski, 2009).

Zależność między wilgotnością sorpcyjną materiału i wilgotnością względną powietrza w stałej temperaturze można graficznie przedstawić w postaci tzw. izoterm sorpcji. Izotermy te pokazują, jaką wilgotność masową osiąga materiał przechowywany w powietrzu o określonej wilgotności względnej i temperaturze (Kubik i Wyrwał, 2009). Sorpcyjność zmienia się w bardzo szerokich granicach i zależy od rodzaju materiału (Tabela 5).

Tabela 5. Wilgotność sorpcyjna wybranych materiałów budowlanych w temperaturze 23 °C przy wilgotności względnej powietrza 80% (Pogorzelski, 2009; Kubik i Wyrwał, 2009)

Materiał budowlany	Wilgotności sorpcyjne (% M) w temperaturze 23 °C, WWP 80%
Beton komórkowy piaskowy	4 – 5,5
Beton komórkowy na popiołach lotnych	5 – 7
Celulozowy materiał termoizolacyjny	17 – 20
Lekki tynk	2 – 5
Lekka zaprawa	3 – 15
Styropian (spieniony polistyren)	0
Pianka poliuretanowa	0
Wełna mineralna	0

Wilgotność sorpcyjna tworzyw sztucznych, takich jak polistyren, poliuretan oraz wyrobów z wełny mineralnej jest zerowa lub prawie zerowa (przy wyższej wilgotności powietrza WWP < 90%, wilgotność sorpcyjna wynosi około 0,1-0,2% M). Również wilgotność sorpcyjna gipsu jest bardzo niska (przy WWP < 90% wilgotność sorpcyjna nie przekracza 1% M). Nieco wyższą wilgotnością sorpcyjną charakteryzują się zaprawy i betony. Do materiałów, które charakteryzuje najwyższa sorpcyjność zaliczyć można materiały celulozowe, np. drewno, papier, celulozowy materiał termoizolacyjny – przy WWP 80% wilgotność sorpcyjna tych materiałów w temperaturze 23 °C wynosi 14-20% M (Pogorzelski, 2009).

Wilgotne materiały budowlane zastosowane w przegrodach – wskutek wysychania, związanego z transportem wilgoci do wnętrza pomieszczeń – wpływają na wzrost wilgotności względnej powietrza. Przez stan wilgotnościowy przegród budowlanych rozumie się rozkład przestrzenny wilgoci i tendencje zmian

wilgotnościowych. Zmiany te wynikają z początkowej wilgotności technologicznej materiałów, przyrostu wilgotności na etapie transportu, składowania, stosowania zaprawy lub betonu do łączenia komponentów (wilgoć budowlana), wysychania (odparowanie do powietrza) i nawilżania przegród budowlanych (opady), przyrostu wilgotności w wyniku eksploatacji lub podciągania kapilarnego wilgoci z gruntu (Pogorzelski, 2009). Najczęściej występujące przyczyny zawilgocenia przegród budowlanych wynikają z wad technicznych lub niewłaściwej eksploatacji mieszkań (Tabela 6).

Tabela 6. Przyczyny zawilgocenia przegród budowlanych (Bogusławska-Kozłowska, 1997; Janińska, 2000; 2002; Rymśa, 2005)

Wady techniczne	Niewłaściwy sposób eksploatacji mieszkań
Wadliwie wykonany mur (wilgoć technologiczna, przemakanie)	Niedostateczne przewietrzanie mieszkań
Stosowanie zawilgoconych materiałów budowlanych	Zaklejanie kratki wentylacyjnych
Zła izolacja fundamentów i ścian piwnicznych	Zimowe uszczelnianie okien (zamknięte okna)
Nieszczelność dachu, rynien, rur	Dostarczanie dużych ilości pary wodnej
Nieszczelność instalacji wodno-kanalizacyjnych i CO	Suszenie odzieży w mieszkaniu
Wadliwe rozwiązania instalacji wentylacyjnej	Nadmiar roślin doniczkowych, duże akwaria
Okna bez wywietrzników	Docieplanie pomieszczeń od strony wewnętrznej
Niedogrzaanie mieszkań	Niewentylowane boazerie
Wadliwe ocieplenie ścian zewnętrznych	Ogrzewanie gazowe
	Stojąca woda, np. nawilżacze powietrza

Przyczyną nadmiernej wilgotności przegród budowlanych w warunkach podniesionej wilgotności względnej powietrza jest zjawisko kondensacji kapilarnej (Pogorzelski, 2009). W takich warunkach następuje wypełnienie parą wodną materiałów kapilarno-porowatych mineralnych (gipsy, zaprawy, betony, cegła) oraz pochodzenia roślinnego (drewno, materiały ligninocelulozowe). Rozwój pleśni w warunkach, kiedy dochodzi do kondensacji pary wodnej postępuje bardzo szybko. Przy wysokiej wilgotności powietrza (96-98%) w temperaturze 28 °C, powierzchnie materiałów wykończeniowych, takich jak tapety, powłoki malarskie, lakiery, pokosty, kleje, już po upływie 6-14 dni od ekspozycji na pleśń zostają całkowicie porośnięte przez grzybnie (Lutowski, 1995). Proces kondensacji kapilarnej nie dotyczy polimerowych syntetycznych materiałów

włóknistych (wełna mineralna), które łatwo ulegają całkowitemu nasyceniu przy zetknięciu z wodą, ale woda wycieka z nich pod wpływem sił grawitacji, utrzymując niewielki stan zawilgocenia. Wilgotność kapilarna jest znacznie wyższa niż sorpcyjna, jednak po ustaniu kontaktu z wodą, materiał wraca do stanu równowagi termodynamicznej z otaczającym powietrzem, w wyniku wysychania (Pogorzelski, 2009).

W budynkach występują pewne miejsca, gdzie obserwuje się stałą kondensację wody na powierzchniach przegród budowlanych. Należą do nich naroża budynków, styk ścian zewnętrznych z dachem, powierzchnie wokół okien, a także miejsca przerw w ciągłej izolacji cieplnej budynku. Wszystkie te miejsca charakteryzują się obniżoną temperaturą powierzchni wewnętrznej (poniżej temperatury tzw. punktu rosy) i wzrostem gęstości strumienia ciepłego (mostki termiczne). Przy podwyższonej wilgotności względnej powietrza oraz szczelnych oknach, stanowią środowisko dogodne dla rozwoju pleśni. Aby zapobiec rozwojowi pleśni, należy nie przekraczać wilgotności sorpcyjnej materiałów budowlanych, a w stanach awaryjnych zawilgocenia kapilarnego należy usunąć wodę z materiału budowlanego (Pogorzelski, 2009).

Istotny wpływ na rozwój grzybów pleśniowych w budynkach ma ruch powietrza. Grzyby rozwijają się intensywnie przy braku ruchu powietrza (wentylacji), co jest zjawiskiem typowym dla uszczelnionych budynków (Janińska, 2000). Problem ten pojawia się obecnie coraz częściej jako efekt uboczny termomodernizacji. Dołożenie warstwy termoizolacyjnej ma w założeniu podnieść temperaturę powierzchni wewnętrznej przegród zewnętrznych. Jednak na skutek regulacji temperatury przez użytkowników mieszkań następuje obniżenie temperatury powierzchni przegród wewnątrz pomieszczeń oraz wzrasta wilgotność powietrza. Jeżeli ochłodzenie przegród jest duże, może dochodzić do kondensacji pary wodnej i rozwoju pleśni (Janińska, 1996).

Proponowane zakresy normatywne dla mikroklimatu pomieszczeń mieszkalnych podają wartości graniczne: temperatura powietrza w pokojach, kuchniach, przedpokojach w zakresie 20-22 °C, w toaletach, łazienkach < 22 °C, temperatura przegród – odpowiednio niższa od temperatury powietrza nie więcej niż o 3 °C, wilgotność względna powietrza 40-60%, w toaletach i łazienkach poniżej 70%, prędkość ruchu powietrza poniżej 0,15 m/s (Śliwowski, 2009). W tych warunkach, optymalnych dla komfortu cieplnego ludzi, nie powinno dochodzić do zjawiska porażen pleśniowych.

Podaje się, iż graniczną wilgotnością masową materiału, poniżej której wzrost pleśni ulega zahamowaniu, jest 11-14% (Żakowska i Stobińska, 2000). Natomiast graniczną wilgotnością względną powietrza w pomieszczeniach, powyżej której mogą pojawiać się problemy porażen pleśniowych jest 70%

(Flannigan i Miller, 1994). Według innych autorów, wartości te mogą być niższe, np. dla papieru wilgotność masowa 8% ogranicza całkowicie wzrost grzybów strzępkowych, natomiast parametry mikroklimatu: poniżej temperatury $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ i WWP $55\pm 5\%$ wpływają hamująco na aktywność tych drobnoustrojów (Niuksza, 1994). Dla porównania, przechowywanie ziarna zbóż w temperaturze 15°C i wilgotności ziarna poniżej 14% nie sprzyja rozwojowi pleśni, ale wzrost temperatury do $20-25^{\circ}\text{C}$ i wilgotności ziarna do poziomu 23% aktywuje wzrost pleśni i tworzenie mikotoksyn już po upływie kilku dni (Chełkowski, 1999). Po wzroście temperatury do 35°C i wilgotności ziarna 23% czas bezpiecznego przechowywania zboża skraca się nawet do kilkunastu godzin (Ryniecki, 1999).

W celu określenia zapotrzebowania na wodę przez drobnoustroje wprowadzono wskaźnik aktywności wody a_w . Przyjmuje się, że dla grzybów strzępkowych optymalne a_w kształtuje się na poziomie 0,96-0,98. W literaturze podaje się jednak znacznie niższy poziom a_w (0,6-0,7), przy których obserwowano już zdolność do kiełkowania i wzrostu grzybów w warunkach modelowych. Na skórze, bawełnie, drewnie również obserwowano wzrost grzybów przy niskich wartościach a_w (0,7-0,8; Nielsen i in., 2004). W uproszczeniu można przyjąć, że jeżeli wartość a_w wynosi 0,8, to znaczy, że materiał jest w równowadze z atmosferą o wilgotności względnej 80% (Zyska, 1999). Grzyby zostały podzielone według wymagań a_w na 3 grupy: pierwotnych (optymalne $a_w < 0,8$), wtórnych ($a_w = 0,8-0,9$) oraz trzeciorzędowych kolonizatorów ($a_w > 0,9$) (Grant i in., 1989). Do pierwotnych kolonizatorów należą gatunki kserofilne rozwijające się w warunkach suchych, np. grzyby z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*.

Grzyby strzępkowe jako typowe organizmy cudzożywne uzależnione są od obecności materii organicznej w środowisku. Rozwijają się na powierzchni materiałów budowlanych, jeżeli znajdą tam odpowiednią ilość pokarmu. Udowodniono, że grzyby strzępkowe mogą wykorzystywać kurz domowy jako źródło substancji pokarmowej w warunkach podwyższonej wilgotności. W warunkach naturalnych wilgotność kurzu jest na poziomie 3-4% (Korpi i in., 1997). Kurz składa się głównie z komórek bakterii, zarodników i strzępek grzybów, wirusów, martwych owadów (prusaków, muchówek i innych) drobnych pajęczaków (roztoczy kurzu z gatunków *Dermatophagoides pteronyssinus* i *Dermatophagoides farinae*) i ich wydaliny, cząstek organicznych pochodzących od ludzi i zwierząt domowych (naskórek, włosy, sierść, wydaliny), cząstek pochodzenia roślinnego (fragmenty roślin ozdobnych, pyłki kwiatowe), drobnych fragmentów tkanin, resztek pokarmowych i innych składników (Zyska, 2001b). Korpi i in. (1997) wykazali, iż kurz o wilgotności 10% stanowi już dobre środowisko dla wzrostu kserofilnych pleśni z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*. Przy wyższej wilgotności rozwijają się w nim inne drobnoustroje, w tym również grzyby keratynoli-

tyczne z rodzajów *Chrysosporium*, *Microsporum*, *Trichophyton* (obecność naskórka, włosów) (Mercantini i in., 1986). Wykazano ponadto, iż kurz domowy może stymulować grzyby do wytwarzania lotnych związków organicznych (Rautiala i in., 1996; Pasanen i in., 1997). Zidentyfikowano ponad 80 związków lotnych, które były wytwarzane przez grzyby w środowisku wilgotnego kurzu domowego (Wolhoff i Wilkins, 1994; Korpi i in., 1997; Pasanen i in., 1997).

Dotychczas nie zbadano, czy kurz stanowi wystarczająco korzystne środowisko sprzyjające syntezie mikotoksyn przez pleśnie.

1.8. Materiały budowlane jako podłoże do wzrostu grzybów strzępkowych

Zdolność grzybów strzępkowych do wzrostu na materiałach budowlanych i wykończeniowych pochodzenia organicznego i nieorganicznego zależy zarówno od budowy chemicznej materiałów, jak również ich właściwości fizycznych, szczególnie tych, które decydują o adsorpcji wody. Pleśnie zdolne są do zasiedlania i degradacji większości materiałów budowlanych organicznych, szczególnie pochodzenia naturalnego. Materiały takie są szeroko stosowane w budownictwie jako elementy konstrukcyjne (drewno, płyty gipsowo-kartonowe), materiały wykończeniowe (tapety, wykładziny naturalne) oraz jako materiał tapicerski (skóry). Pod względem chemicznym materiały te należą do naturalnych polimerów organicznych, w skład których wchodzi głównie: celuloza, lignina, hemicelulozy (drewno, karton, tapeta papierowa, wykładzina bawełniana, lniana), białka – keratyna, kolagen (skóry wyprawione, wykładziny podłogowe wełniane). Niektóre materiały są mieszaninami polimerów naturalnych i syntetycznych (tapety winylowe, wykładziny podłogowe) lub polimerami syntetycznymi (skóra syntetyczna, wykładzina PCV). Materiały te charakteryzują się z reguły wysoką chłonnością wody, co stwarza dobre środowisko dla rozwoju grzybów strzępkowych. Powszechnie stosowane w budownictwie drewno ma właściwości higroskopijne, czego skutkiem są częste porażenia pleśniowe (Bjurman, 1994; Viitanen i Bjurman, 1995; Seifert i Frisvad, 2000). Dodatkowo stosowane technologie suszenia drewna czynią jego powierzchnię bardziej podatną na rozwój pleśni na skutek wstępnej degradacji celulozy do łatwo dostępnych pochodnych (Thelander i in., 1993). Znane są gatunki pleśni, które niszczą drewno stosowane w pomieszczeniach, np. *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Chaetomium globosum*, *Ulocladium chartarum*, *Cladosporium herbarium*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium expansum* i inne gatunki (Nielsen, 2002). Pleśnie znane są ze swoich zdolności do wytwarzania enzymów zewnątrzkomórkowych, należących do grupy celulaz, degradujących materiały celulozowe do krótszych oligomerów oraz łatwo przyswajalnej glukozy (Zyska i Żakowska,

2005; McGinnis, 2007). W degradacji drewna, obok grzybów strzępkowych, swój udział mają również inne grzyby, przede wszystkim *Basidiomycota* (Ważny i Karyś, 2001). W kraju prowadzone są badania nad wykorzystaniem różnych biocydów do ochrony przed korozją biologiczną drewna, np. pochodnych triazolu i innych związków chemicznych (Krajewski, 2001). Ważny i Kundzewicz (2009) pracują nad nanobiocydami dla ochrony drewna.

Wiele gatunków pleśni obecnych w powietrzu wewnątrz budynków jest zdolnych do zasiedlania tapet papierowych oraz płyt gipsowo-kartonowych. Szczególnie często z powierzchni tych materiałów izolowane były pleśnie *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus versicolor*, które charakteryzuje wysoka aktywność enzymów celulolitycznych na wilgotnym papierze (Nikulin i in., 1994; Miller i in., 2000; Flannigan, 2001a).

Dodatkowym źródłem węgla dla grzybów rozwijających się na tapetach i płytach gipsowo-kartonowych są kleje skrobiowe i kazeinowe, stosowane do klejenia tapet oraz papieru do płyty gipsowej (Grant i in., 1989; Lutomski, 1995; Flannigan, 2001a). Pomimo stosowania różnych fungicydów (związków chemicznych ograniczających wzrost grzybów) jako dodatku do klejów, niektóre grzyby zdolne są do wzrostu w takim środowisku (Piotrowska i Żakowska, 2003).

W mieszkaniach wykorzystywane są także inne materiały pochodzenia organicznego, naturalne jak i syntetyczne, np. włókniny w postaci wykładzin podłogowych, tapet tekstylnych, filtrów w systemach wentylacyjnych. Powierzchnie tych materiałów mogą chłonać wodę z różną intensywnością; odpowiednio nawilżone mogą być łatwo zasiedlone przez pleśnie z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, obecne często w powietrzu pomieszczeń.

Również skóra naturalna wykorzystywana w tapicerstwie, charakteryzująca się wysoką higroskopijnością, jest chętnie zasiedlana przez grzyby wykazujące właściwości proteolityczne, w tym keratynolityczne grzyby patogenne (Falkiewicz-Dulik, 2005). Nawet skóra syntetyczna (poliester pokryty warstwą polichlorku winylu) w warunkach wysokiej wilgotności, mimo hydrofobowej powierzchni, może być kolonizowana przez pleśnie, które degradują wiązania estrowe, przyczyniając się do wzrostu kruchości i zmian w wytrzymałości tego materiału.

Stwierdzono, iż biosynteza określonych enzymów zewnątrzkomórkowych przez pleśnie jest stymulowana przez skład chemiczny materiału budowlanego. Pleśnie w środowisku budowlanym zmieniają profil syntetyzowanych enzymów, dzięki czemu w pełni wykorzystują dostępny substrat. Rosnąc na materiałach celulozowych, wytwarzają enzymy, takie jak np. α -galaktozydazę, β -galaktozydazę, N-acetyloglukuronidazę, natomiast na podłożu z dodatkiem kazeiny (składnik kleju) uaktywniają enzymy proteolityczne, np. akrylamidazę cystynową, trypsynę (Gutarowska, 2010).

W wyniku rozwoju grzybów strzępkowych, materiały budowlane pochodzenia organicznego (celulozowe, białkowe, polimery syntetyczne) zmieniają swoją wytrzymałość, ulegają przebarwieniu, rozrywają się, rozpadają, czasami kruszeją (skóra naturalna i syntetyczna). Rozwojowi drobnoustrojów na tych materiałach sprzyja nie tylko ich skład chemiczny, ale także struktura geometryczna (grubość, gęstość spłotu we włókninach, nierówności powierzchni – tapety wytłaczane, drewno, wykładziny podłogowe). Utrzymanie odpowiedniej wilgotności na powierzchni tych materiałów jest niezbędne do rozwoju grzybów tylko w początkowej fazie wzrostu. Kiedy pleśnie utworzą grzybnie, wilgoć jest zatrzymywana w jej strukturze i w ten sposób umożliwia aktywność większości enzymów hydrolitycznych.

Materiały budowlane pochodzenia nieorganicznego (kamień, gips, zaprawy, beton, cement, tynki) są niekorzystnym środowiskiem dla wzrostu pleśni, co wynika z braku dostępnych źródeł węgla organicznego. Dodatkowym czynnikiem niektórych materiałów nieorganicznych, warunkującym oporność na wzrost grzybów jest wysokie pH. Materiały te mają szerokie zastosowanie w budownictwie jako elementy konstrukcyjne. Stosowane są również do wykańczania wnętrz (gładzie, tynki). Niestety, niektóre materiały budowlane nieorganiczne (beton, gips, zaprawa, tynki) mają budowę kapilarno-porowatą oraz właściwości higroskopijne; pochłaniają wodę z powietrza oraz na skutek podciągania kapilarnego z gleby. W niektórych przypadkach (beton) woda może wypełnić nawet do 40% objętości w stosunku do całkowitej objętości materiału (Pogorzelski, 2009). Przy podwyższonej wilgotności tych materiałów, grzyby są zdolne do wzrostu pod warunkiem obecności materii organicznej, np. w postaci zabrudzeń, kurzu (Pasanen i in., 1997). Drobnoustroje podczas wzrostu na materiałach budowlanych nieorganicznych ukierunkowują swój metabolizm na produkcję kwasów, które mogą być przyczyną korozji tych materiałów (Gutarowska i Czyżowska, 2009). W korozji materiałów budowlanych bardzo duże znaczenie mają kwasy organiczne wytwarzane przez pleśnie (Warscheid i Braams, 2000; Abin i in., 2002). Pleśnie wytwarzają takie kwasy, jak: cytrynowy, jabłkowy, itakonowy, mlekowy, winowy, glukonowy, fumarowy, szczawiowy, bursztynowy i inne (Eckhardt, 1978; Żakowska i Piotrowka, 2008). Zdolność tworzenia przez pleśnie kwasów na betonie i kamieniach była opisywana w literaturze jako czynnik korozyjny (Kuroczkin i in., 1988; de La Torre i in., 1991; Cwalina, 2003; Cwalina i Zyska, 2005). Szczególnie wysoką aktywnością kwasotwórczą charakteryzują się grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* (de La Torre i in., 1991; Gomez-Alarcon i in., 1994; Gutarowska i Czyżowska, 2009). Między składnikami nieorganicznego materiału budowlanego (minerałami zawierającymi Ca, Fe, Al, Mg, K, Na) a wydzielanymi kwasami zachodzą reakcje chemiczne,

w wyniku czego powstają sole rozpuszczalne w wodzie, a składniki mineralne są wypłukiwane z materiału (Warscheid i Braams, 2000; Wasserbauer, 2003). Materiał staje się wtedy mniej wytrzymały, kruszy się i rozpada, a stopień zniszczenia zależy od rodzaju kwasu oraz czasu jego działania. Procesy te dotyczą szczególnie takich materiałów, jak kamień, zaprawa, gips (Palmer i in., 1991; May i in., 1993; Warscheid i Braams, 2000). W reakcji z kwasem bursztynowym i szczawiowym mogą powstawać sole nierozpuszczalne w wodzie, np. szczawian wapnia tworzy się poprzez wiązanie wapnia pochodzącego z węglanu wapnia (np. w zaprawie), w wyniku czego może dochodzić do naruszenia struktury materiału budowlanego. Obecność kryształów szczawianów na powierzchniach kamienia budowlanego potwierdzili w badaniach Allesandrini i in. (1989), a także Gomez-Alarcon i in. (1994). Procesy korozji elementów konstrukcyjnych są przyczyną opisywanych awarii w budownictwie (Zyska, 1999).

Powłoki malarskie stosowane na powierzchni materiałów nieorganicznych są zasiedlane z łatwością przez grzyby strzępkowe, mimo iż na ogół nie stanowią dostępnego źródła węgla dla tych drobnoustrojów (organiczne dyspersje tworzyw sztucznych). Niektóre tylko gatunki pleśni, np. *Aureobasidium pullulans* mają zdolność do degradacji powłok akrylowych. Powłoki emulsyjne są natomiast porastane przez biofilmy, w skład których wchodzi bakterie (w tym sinice) oraz grzyby strzępkowe (Gaylarde i Morton, 199; Morton, 2003). Strzępki grzybów pleśniowych są odpowiedzialne za fizyczne niszczenie powłok malarskich, gdyż mają zdolność wnikania w strukturę powłoki, powodując utratę spójności, odpadanie tynków, przebarwienia i kruszenie materiałów nieorganicznych pod powłoką (Morton, 2003).

Grzyby strzępkowe zdolne są również do wzrostu na powierzchniach syntetycznych polimerów, w warunkach takich, jak opisano dla materiałów nieorganicznych – przy wysokiej wilgotności i dostępie do źródeł węgla. Syntetyczne materiały polimerowe znajdują zastosowanie w budownictwie jako materiały izolacyjne (pianka poliuretanowa, styropian, wełna mineralna) oraz wykończeniowe (poliestry, PCV, polipropylen, poliakryl – składniki wykładzin podłogowych). Charakteryzują się małą sorpcyjnością wody. Mimo to w literaturze opisywany był wzrost grzybów *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* sp. na piankach poliuretanowych, wełnie mineralnej oraz PCV (Ezeonu i in., 1994; Webb i in., 2000; Zyska i Żakowska, 2005). Materiały izolacyjne charakteryzujące się rozbudowaną powierzchnią właściwą z dużą ilością por i kapilar, ponadto wysoką chropowatością powierzchni, w tym styropian (budowa komórkowa) i wełna mineralna (budowa włóknista), przy długotrwałym wysokim nawilżeniu mogą być porastane przez pleśń. Mechanizmy oparte zarówno na degradacji enzymatycznej, jak również korozji na skutek wydzielania kwasów przez grzyby,

są odpowiedzialne za kruchość, spadek wytrzymałości i niszczenie materiałów polimerowych.

Z tego krótkiego przeglądu wynika, że wszystkie materiały budowlane mogą stanowić podłoże dogodne dla wzrostu grzybów strzępkowych, które przyczyniają się do ich niszczenia. Konieczna jest więc znajomość podatności materiałów stosowanych obecnie w budownictwie na kolonizację przez te mikroorganizmy, a także czynników sprzyjających temu procesowi. Z drugiej strony oznaczanie liczby i rodzaju grzybów strzępkowych zasiedlających zawilgocone pomieszczenia oraz wytwarzanych przez nie alergenów i mikotoksyn ma ogromne znaczenie dla ustalenia etiologii chorób mieszkańców. Bardzo istotna jest również analiza cytotoksyczności i genotoksyczności zagrzybionych powierzchni budowlanych.

Ocena wzrostu, toksyczności i alergenicności pleśni powinna w warunkach laboratoryjnych przebiegać w środowisku zbliżonym do rzeczywistego występowania tych mikroorganizmów, tj. na materiałach budowlanych. Pełna wiedza na temat niebezpieczeństw związanych z obecnością grzybów strzępkowych w środowisku budowlanym może przyczynić się do oceny rzeczywistego narażenia zdrowotnego.

2. GENEZA I CEL PRACY

Grzyby strzępkowe, zasiedlając przegrody budowlane, wytwarzają znaczne ilości zarodników i fragmentów grzybni, które mogą być nośnikiem białek alergennych oraz mikotoksyn. Cyto- i genotoksyczne efekty wywołane mikotoksynami są przyczyną licznych chorób.

Wiedza o pleśniach i ich metabolitach, pochodząca głównie z badań laboratoryjnych, nadal nie jest w pełni wykorzystywana w mikologii budowlanej. Rutynowe badania mikologiczne pomieszczeń mieszkalnych obejmują oznaczenia ilościowe i jakościowe pleśni na powierzchni przegród budowlanych oraz w powietrzu. Wyizolowane i oznaczone do gatunku szczepy, klasyfikowane w oparciu o literaturę jako toksynotwórcze lub alergenne, nie zawsze wykazują te właściwości na przegrodach budowlanych w budynkach. Dopiero w ustalonych warunkach laboratoryjnych, w hodowlach na podłożach mikrobiologicznych, izolaty grzybów z mieszkań ujawniają swoją toksynotwórczość.

Wyjaśnienie rzeczywistych zagrożeń zdrowotnych ze strony grzybów strzępkowych rozwijających się na przegrodach budowlanych przy obecnym stanie wiedzy nie jest możliwe, ponieważ dotąd nie prowadzono badań właściwości toksynotwórczych, cytotoksycznych, genotoksycznych oraz alergennych na materiałach budowlanych. Nie wiadomo czy mikotoksyny i/lub alergeny są syntetyzowane na wszystkich rodzajach materiałów budowlanych, zarówno pochodzenia organicznego, jak i na nieorganicznych? Jakie warunki panujące w pomieszczeniach mieszkalnych decydują o tworzeniu białek alergennych i mikotoksyn? Potrzeba poznania odpowiedzi na postawione pytania stała się motywacją do sformułowania celu prezentowanej pracy.

Celem badań było określenie podatności wybranych materiałów budowlanych, wykończeniowych i termomodernizacyjnych na zasiedlanie przez grzyby strzępkowe występujące w budynkach, a także poznanie przyczyn tego zjawiska oraz wykazanie szkodliwości zdrowotnej pleśni obecnych w mieszkaniach. Realizacja tego celu wymagała przeprowadzenia badań środowiskowych, których zakres obejmował ocenę rozwoju grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych oraz zanieczyszczenia powietrza wewnętrznego, identyfikację grzybów obecnych w budynkach, analizę mikotoksyn wytwarzanych na przegrodach budowlanych oraz określenie ich cyto- i genotoksyczności. Dla pełniejszej oceny przyczyn pojawienia się grzybów strzępkowych w mieszkaniach i skutków ich oddziaływania na zdrowie ludzi przeprowadzono również badania ankietowe przyczyn zagrzybienia mieszkań oraz badania lekarskie mieszkańców.

Drugi etap pracy przeprowadzony był w warunkach modelowych i miał na celu ocenę wzrostu grzybów strzępkowych na różnych materiałach budowlanych oraz określenie zdolności do wytwarzania w tych warunkach białek alergennych i mikotoksyn, a także wywołania efektów cytotoksycznych i genotoksycznych. W tym etapie badano wzrost pleśni na materiałach budowlanych oraz wykończeniowych pochodzenia organicznego i nieorganicznego, w różnych warunkach wilgotności, obecności kurzu domowego i związków organicznych. Badano również zdolność pleśni do tworzenia na materiałach budowlanych mikotoksyn i alergenów oraz ich cyto- i genotoksyczność. Stworzyło to merytoryczne i praktyczne podstawy do oceny rzeczywistego zagrożenia zdrowotnego dla użytkowników pomieszczeń z aktywnym rozwojem pleśni.

3. METODYKA BADAŃ

3.1. Obiekt badań środowiskowych – mieszkania i mieszkańcy

Badania przeprowadzono w 34 budynkach mieszkalnych (72 pomieszczenia) z objawami rozwoju pleśni na przegrodach budowlanych oraz w 30 budynkach kontrolnych (70 pomieszczeń) bez tych objawów. Badania wykonano w sezonie zimowym (od listopada do marca) w kamienicach z XIX wieku, domach jednorodzinnych oraz blokach na terenie Łodzi (Tabela 7).

Tabela 7. Badane budynki mieszkalne

Rodzaj budynku i rok budowy	Budynki zagrzybione N = 34	Budynki bez zagrzybienia N = 30
Kamienice XIX w. (N = 22)	14	8
Domy jednorodzinne (rok budowy < 2000) (N = 7)	5	2
Domy jednorodzinne (rok budowy > 2000) (N = 6)	3	3
Bloki (rok budowy < 2000) (N = 23)	9	14
Bloki (rok budowy > 2000) (N = 6)	3	3

Wśród mieszkańców przeprowadzono ankietę, na podstawie której dokonano oceny przyczyn zagrzybienia. Ankieta zawierała pytania o rodzaj budownictwa, rok budowy, rodzaj zagrzybionych pomieszczeń i miejsca zagrzybienia, rodzaj ogrzewania, stolarki okiennej, obecność wentylacji i stęchłego-pleśniowego zapachu. Ankietę uzupełniono o pomiary wilgotności i temperatury powietrza w pomieszczeniach, przeprowadzone za pomocą higrometru włosowego wyposażonego w termometr (typ Max-Min Thermo-Hygro).

W każdym badanym pomieszczeniu oznaczano liczbę grzybów strzępkowych obecnych w powietrzu i na przegrodach budowlanych, przeprowadzono analizę gatunkową grzybów, analizę toksyczności wymazów ze ścian (oznaczanie mikotoksyn, cytotoksyczności ogólnej) oraz – dla wybranych pomieszczeń – analizę genotoksyczności wymazów. Kontrolnie zbadano zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza atmosferycznego przed każdym badanym budynkiem.

Przeprowadzono także ocenę stanu zdrowia mieszkańców. Badaniem lekarskim objęto 91 osób (średnia wieku: 37 lat \pm 10,5; płeć: 40% kobiety, 60% mężczyźni), w tym 49 osób zamieszkujących pomieszczenia z widocznymi objawami zagrzybienia oraz 42 osoby zamieszkujące mieszkania określone w pracy jako kontrolne, bez objawów zagrzybienia.

Badania lekarskie przeprowadzone były przez lekarza alergologa w ramach współpracy z Instytutem Medycyny Pracy w Łodzi. Obejmowały one wywiad (ankieta lekarska), testy skórne wobec popularnych alergenów, w tym alergenów grzybów, oznaczenie poziomu przeciwciał klasy IgE w surowicy oraz swoistych wobec pleśni przeciwciał asIgE (p. 3.12). U czterech mieszkańców, którzy we wstępnych testach diagnostycznych wykazywali największe uczulenie na pleśnie (na podstawie objawów, testów skórnych SPT, poziomu IgE, asIgE) oznaczono w surowicy obecność przeciwciał w stosunku do pleśni wyizolowanych z mieszkań (p. 3.13).

3.2. Charakterystyka materiału biologicznego

Z budynków mieszkalnych wyizolowano i zdiagnozowano łącznie 186 szczepów pleśni należących do 36 gatunków (p. 3.6). Przechowywano je w formie czystych kultur na pożywce z brzeczką i agarem oraz na tapecie i płycie gipsowo-kartonowej, w temperaturze 4°C. Zdolność tworzenia wybranych mikotoksyn (aflatoksyny B1, ochratoksyny A, sterigmatocystyny) przez badane izolaty określono metodą chromatografii cienkowarstwowej TLC (p. 3.9.1). Czternaście wybranych szczepów grzybów strzępkowych poddano szczegółowym badaniom laboratoryjnym, oznaczając ich zdolność do produkcji mikotoksyn, alergenów oraz cytotoksyczność ogólną i genotoksyczność. Kryterium wyboru szczepów stanowiła toksynotwórczość ujawniona na pożywce laboratoryjnej. Uwzględniono również występowanie objawów chorobowych u mieszkańców pomieszczeń, z których wyizolowano poszczególne szczepy pleśni. Wykaz szczepów uwzględniający miejsce ich izolacji oraz zakres wykorzystania w badaniach przedstawiono w tabeli 8. W badaniach wykorzystywano również szczepy wzorcowe (kolekcyjne): *Aspergillus flavus* KA 30 pochodzący z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 – pochodzący z Northern Regional Research Laboratory, USDA, Culture Collection Peoria, IL, USA. Szczepy te charakteryzowały się zdefiniowaną, wysoką toksynotwórczością.

Tabela 8. Szczepy grzybów strzępkowych stosowane w badaniach laboratoryjnych

Lp.	Szczep	Miejsce izolacji ze środowiska mieszkaniowego	Badania
Szczepy dzikie			
1	<i>Alternaria alternata</i>	powłoka malarska	obecność przeciwciał w surowicy krwi mieszkańców potwierdzających występowanie alergii; wytwarzanie alergenów na materiałach budowlanych
2	<i>Aspergillus flavus</i>	płyta gipsowo-kartonowa	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych; obecność przeciwciał w surowicy krwi mieszkańców potwierdzających występowanie alergii; wytwarzanie alergenów na materiałach budowlanych
3	<i>Aspergillus niger</i> 1	powietrze wewnętrzne	występowanie alergii u mieszkańców metodą immunoblotting; wytwarzanie alergenów na materiałach budowlanych
4	<i>Aspergillus niger</i> 2	powłoka malarska	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
5	<i>Aspergillus ochraceus</i> 1	powłoka malarska	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
6	<i>Aspergillus ochraceus</i> 2	płyta gipsowo-kartonowa	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
7	<i>Aspergillus versicolor</i> 1	płyta gipsowo-kartonowa	wzrost i toksynotwórczość na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
8	<i>Aspergillus versicolor</i> 2	tapeta	wzrost i toksynotwórczość na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
9	<i>Aspergillus versicolor</i> 3	powłoka malarska	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych

10	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	płyta gipsowo-kartonowa	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych; obecność przeciwciał w surowicy krwi mieszkańców potwierdzających występowanie alergii; wytwarzanie alergenów na materiałach budowlanych
11	<i>Penicillium chrysogenum</i>	płyta gipsowo-kartonowa	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych, obecność przeciwciał w surowicy krwi mieszkańców potwierdzających występowanie alergii; wytwarzanie alergenów na materiałach budowlanych
12	<i>Penicillium expansum</i>	tapeta	obecność przeciwciał w surowicy krwi mieszkańców potwierdzających występowanie alergii; wytwarzanie alergenów na materiałach budowlanych
13	<i>Stachybotrys chartarum</i>	tapeta	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
14	<i>Trichoderma viride</i>	drewno nielakierowane	wzrost na materiałach budowlanych
Szczepy kolekcyjne			
15	<i>Aspergillus flavus</i> KA30	Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Poznań	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych
16	<i>Aspergillus ochraceus</i> NRLL 3174	Northern Regional Research Laboratory, USDA, Culture Collection Peoria, IL, USA	wzrost, toksynotwórczość, cytotoksyczność i genotoksyczność na pożywkach laboratoryjnych i materiałach budowlanych

3.3. Pożywki mikrobiologiczne

W badaniach wykorzystywano pożywki mikrobiologiczne, których skład oraz zastosowanie przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Pożywki mikrobiologiczne

Rodzaj podłoża	Skład, pH, opis	Zastosowanie w badaniach
MEA (malt extract agar) – brzeczka słodowa z chloramfenikolem	Brzeczka słodowa 7 °Blg Agar (1,5 %) Chloramfenikol (1 %) pH = 5,6 ± 0,2	izolacja pleśni z powietrza oraz przegród budowlanych; przechowywanie szczepów; ocena toksynotwórczości, cytotoksyczności, genotoksyczności, na materiałach budowlanych oraz pożywce laboratoryjnej (kontrola)
Pożywka DG18 z dichloranem sodu, glicerolem i chloramfenikolem (Oxoid)	Pepton 5,0 g Glukoza 10,0 g KH ₂ PO ₄ 1,0 g MgSO ₄ ×5H ₂ O 0,5 g Dichloran sodu 0,002 g Agar 15,0 g Woda destylowana do 1000 ml Glicerol 175 ml Chloramfenikol 1 % pH = 5,6 ± 0,2	izolacja pleśni kserofilnych z powietrza oraz przegród budowlanych
Pożywka Czapka (CYA – Czapek Yeast Autolysate Agar) – agar drożdżowy Czapka	KH ₂ PO ₄ 1 g Sole CYA* 10 ml (*NaNO ₃ -30 g, KCl -5 g, ZnSO ₄ ×7H ₂ O - 0,1 g, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 5 g, FeSO ₄ ×7H ₂ O -0,1 g, CuSO ₄ ×5H ₂ O -0,005 g, Woda destylowana do 100 ml) Ekstrakt drożdżowy 5 g Sacharoza 30 g Agar 15 g Woda destylowana do 1000 ml pH = 6,2 ± 0,2	identyfikacja morfologiczna pleśni wyizolowanych w pomieszczeniach mieszkalnych

Pożywka YES (Yeast Extract sucrose Agar) – agar z ekstraktem drożdżowym i sacharozą	<div> <div>Ekstrakt drożdżowy</div> <div>20 g</div> </div> <div> <div>Sacharoza</div> <div>150 g</div> </div> <div> <div>MgSO₄×7H₂O</div> <div>0,5 g</div> </div> <div> <div>Sole YES**</div> <div>1 ml</div> </div> <div> <div>(**ZnSO₄×5H₂O - 0,1 g, CuSO₄×5H₂O - 0,005 g, Woda destylowana do 100 ml)</div> <div></div> </div> <div> <div>Agar</div> <div>20 g</div> </div> <div> <div>Woda destylowana do 1000 ml</div> <div></div> </div> <div> <div>pH = 5,8 ± 0,2</div> <div></div> </div>	<div> <div>oznaczanie</div> <div>toksynotwórczości pleśni;</div> <div>ocena wzrostu pleśni</div> <div>i toksynotwórczości na</div> <div>materiałach budowlanych</div> <div>z dodatkiem pożywki YES,</div> <div>pożywki Mo lub</div> <div>zanieczyszczonych kurzem</div> </div>
Pożywka mineralna Mo	<div> <div>MgSO₄×7H₂O</div> <div>5 g</div> </div> <div> <div>(NH₄)₂SO₄</div> <div>3 g</div> </div> <div> <div>KH₂PO₄</div> <div>1 g</div> </div> <div> <div>Woda destylowana do 1000 ml</div> <div></div> </div> <div> <div>pH = 5,8 ± 0,2</div> <div></div> </div>	<div> <div>wzrost pleśni i toksyno-</div> <div>twórczość na materiałach</div> <div>budowlanych z dodatkiem</div> <div>pożywki YES, pożywki Mo</div> <div>lub zanieczyszczonych kurzem</div> </div>
Pożywka Mo z kurzem	<div> <div>MgSO₄×7H₂O</div> <div>5 g</div> </div> <div> <div>(NH₄)₂SO₄</div> <div>3 g</div> </div> <div> <div>KH₂PO₄</div> <div>1 g</div> </div> <div> <div>Kurz domowy lekki</div> <div>10 g</div> </div> <div> <div>Woda destylowana do 100 ml</div> <div></div> </div> <div> <div>pH = 5,8 ± 0,2</div> <div></div> </div> <div> <div>Kurz domowy lekki –</div> <div>pochodzący z mieszkania</div> <div>(zbierany z powierzchni półek).</div> <div>Pożywkę Mo z kurzem mieszano</div> <div>na mieszadle magnetycznym</div> <div>w celu rozbicia kurzu na drobne</div> <div>cząstki i równomiernego</div> <div>rozprowadzenia w podłożu.</div> </div>	<div> <div>wzrost pleśni</div> <div>i toksynotwórczość</div> <div>na materiałach budowlanych</div> <div>z dodatkiem pożywki YES,</div> <div>pożywki Mo</div> <div>lub zanieczyszczonych</div> <div>kurzem</div> </div>
Pożywka mineralna Mo z ekstraktem drożdżowym (płynna oraz stała)	<div> <div>MgSO₄×7H₂O</div> <div>5 g</div> </div> <div> <div>(NH₄)₂SO₄</div> <div>3 g</div> </div> <div> <div>KH₂PO₄</div> <div>1 g</div> </div> <div> <div>Ekstrakt drożdżowy</div> <div>20 g</div> </div> <div> <div>Woda destylowana do 1000 ml</div> <div></div> </div> <div> <div>pH = 5,8 ± 0,2</div> <div></div> </div> <div> <div>Agar (p.stałe)</div> <div>20 g</div> </div>	<div> <div>wzrost pleśni na materiałach</div> <div>budowlanych i wykończenio-</div> <div>wych o różnym poziomie</div> <div>wilgotności masowej; ocena</div> <div>alergenności na materiałach</div> <div>budowlanych oraz pożywce</div> <div>laboratoryjnej (kontrola)</div> </div>

Pożywki mikrobiologiczne sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121 °C, przez 20 minut.

3.4. Materiały budowlane

Materiały budowlane pochodziły ze sprzedaży detalicznej (cement, gips, zaprawa, płyta gipsowo-kartonowa, tapeta, wykładzina dywanowa, wykładzina PCV) lub hurtowej (drewno) oraz z zakładu usługowego (skóra, skaj). Charakterystykę stosowanych materiałów podano w tabeli 11.

3.5. Wilgotność materiałów budowlanych

Wilgotność badanych materiałów oznaczano metodą wagową. Materiały suszono do stałej masy w temperaturze 105 °C (z wyjątkiem gipsu – temperatura suszenia: 70 °C oraz materiałów zawierających tworzywa sztuczne 45 °C).

Wilgotność masową obliczano ze wzoru (Stefańczyk, 2009):

$$W = \frac{M_w - M_s}{M_s} \times 100\%$$

gdzie: W – wilgotność masowa materiału (%),

M_w – masa materiału w stanie wilgotnym (g),

M_s – masa materiału w stanie suchym (g).

Po oznaczeniu wilgotności masowej materiałów, doprowadzano ich wilgotność do założonego początkowego poziomu (Tabela 10), poprzez dodanie 0,1 ml pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym (lub innej pożywki, w zależności od doświadczenia) oraz odpowiedniej objętości jałowej wody destylowanej. Poziom ten ustalono na podstawie doświadczenia, w którym określano maksymalną objętość wody wchłanianą przez materiał. Tak nawilżone próbki materiałów wykorzystywano do hodowli grzybów strzępkowych. W doświadczeniach mających na celu ocenę wpływu wilgotności na wzrost i tworzenie mikotoksyn stosowano cztery warianty wilgotności masowej materiałów, tj. maksymalną (maksymalna objętość pożywki Mo z ekstraktem, wody oraz inokulum), minimalną (bez dodatku wody, tylko pożywka Mo i inokulum) oraz dwie średnie wilgotności masowe (różna objętość wody oraz pożywka Mo i inokulum).

Po wprowadzeniu inokulum do materiałów budowlanych oraz dodaniu odpowiedniej objętości wody, oznaczono masę próbek. W czasie trwania hodowli grzybów na materiałach budowlanych, codziennie ważono próbki materiałów i utrzymywano w nich poziom wilgotności przez dodatek odpowiedniej objętości wody destylowanej do uzyskania masy początkowej.

Tabela 10. Początkowe wilgotności masowe materiałów budowlanych stosowanych w badaniach

Materiał budowlany/wykończeniowy	Wilgotność masowa (%)
Cement	35
Gips	17, 33, 48, 68
Zaprawa tynkarska	43
Zaprawa tynkarska pokryta farbą emulsyjną	4, 5, 7, 11
Drewno	220
Płyta gipsowo-kartonowa	80
Tapeta	18, 56, 79, 126
Wykładzina dywanowa	143
Wykładzina PCV	30
Skóra	181
Skaj	70

3.6. Analiza mikologiczna w budynkach mieszkalnych

W budynkach mieszkalnych oznaczano liczbę grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych oraz w powietrzu.

3.6.1. Analiza mikologiczna powierzchni przegród budowlanych

Próbki z przegród budowlanych (tynki, tapety, powłoki malarskie) pobrano z powierzchni 100 cm² metodą wymazu do soli fizjologicznej (50 ml 0,85% NaCl). Rozcieńczony roztwór wysiewano na pożywkę MEA z chloramfenikolem i inkubowano w temperaturze 25°C przez 5-7 dni. Po tym czasie liczono kolonie. Wyniki podawano jako liczbę jtk/100 cm² w powierzchni przegrody budowlanej.

3.6.2. Analiza mikologiczna powietrza pomieszczeń

Analizę zanieczyszczenia grzybami strzępkowymi powietrza pomieszczeń mieszkalnych, jak również powietrza atmosferycznego (próbka kontrolna), przeprowadzono metodą hodowlaną, stosując do poboru powietrza próbnik Mass 100 Eco (*Merck*). Objętości pobieranych próbek powietrza wynosiły 50-100 l powietrza. Do hodowli pleśni stosowano pożywkę MEA z chloramfenikolem oraz pożywkę DG18; inkubację prowadzono w temperaturze 25°C, przez 5-7 dni. Po tym czasie zliczano kolonie grzybów; wyniki podawano w jtk/m³ powietrza.

Tabela 11. Charakterystyka badanych materiałów budowlanych (Stefańczyk, 2009)

Materiał budowlany	Budowa, wybrane właściwości chemiczne i fizyczne	Zastosowanie
Gips budowlany (<i>Dolina Nidy</i>)	Gips klasy GTM (zgodnie z wymaganiami PN-B-30042:1997) Skład – siarczan wapnia, woda, substancje dodatkowe (plastyfikatory, środki adhezyjne, regulatory konsystencji, regulatory czasu twardnienia). Materiał mikroporowaty, nieodporny na czynniki środowiska. Wykazuje nasiąkliwość 25-40%, higroskopijność przy WWP 100% na poziomie 0,8-1,5%. Wytrzymałość maleje nawet do 70% na skutek nawilżenia.	Tynki wewnętrzne, sztukateria, wyroby formowane, drobne naprawy tynku, gładź na tynkach cementowo-wapiennych
Cement (<i>Ożarów</i>)	Cement CE II 32,5R z dodatkami (zawartość siarczanów max. 2,9%, chlorków 0,024%). Spoiwo hydrauliczne, tj. drobno zmielony materiał mineralny (krzemiany wapnia, glin i żelazo i inne) po zmieszaniu z wodą tworzy zaczyn wiążący i twardniejący w wyniku reakcji hydratacji (uwodnienia). Składnik główny – klinkier portlandzki; składniki dodatkowe: żużel wielkopiecowy oraz popiół lotny krzemionkowy; inne składniki dodatkowe: pucolany składające się głównie z reaktywnego dwutlenku krzemu i tlenku glinu, a także tlenku żelaza i innych metali. Materiał kapilarno-porowaty. Wysoka odporność na agresję chemiczną, ścieranie, na wysokie i niskie temperatury. Po związaniu nie wchłania wody. Wysoka wytrzymałość mechaniczna.	Konstrukcje budowlane, posadzki i nawierzchnie
Zaprawa tynkarska (tynki) (<i>Atlas</i>)	Zaprawa tynkarska klasy CS II (PN-EN 998-1), do wykonywania tynków wewnętrznych. Mineralne spoiwo budowlane. Wyróżniamy zaprawy gipsowe, gipsowo-piaskowe, gipsowo-wapienne, wapienno-gipsowe (w zależności od spoiwa). Zaprawy zawierają krzemionkę, tlenki wapnia, żelaza, magnezu, glinu, siarki. Do zapraw dodaje się środki przyspieszające wiązanie, napowietrzające, uszczelniające itp. Zaprawa przepuszcza parę wodną.	Tynkowania ścian i sufitów w pomieszczeniach oraz na zewnątrz
Drewno	Drewno stosowane w badaniach: sosnowe, nielakierowane. Celuloza (45-55% masy), ligniny (20-30%), hemicelulozy (12-20%) oraz niewielkie ilości żywic, garbników, tłuszczów, białek i substancji mineralnych. Zarówno celuloza, jak i lignina są nierozpuszczalne w wodzie i w większości rozpuszczalników organicznych. Kwasy nieorganiczne powodują pęcznienie i hydrolizę drewna. Roztwory alkaliów działają niszcząco na drewno, natomiast większość soli mineralnych impregnuje i konserwuje drewno. Uodpornienia drewna na korozję dokonuje się także przez nasycenie go związami syntetycznymi, które ulegają kondensacji lub polimeryzacji w tkankach drewna. Materiał włóknisty anizotropowy. Dopuszczalna wilgotność $15 \pm 3\%$. Właściwości takie, jak: pęcznienie i kurczliwość, wytrzymałość na ściskanie, rozciąganie, zginanie i twardość zależą od wilgotności drewna. Wytrzymałość i twardość drewna maleje ze wzrostem wilgotności. Wysoka higroskopijność i zdolność do pęcznienia (przy 100% WWP pęcznienie włókien o 40-100%). Drewno traci swoją wytrzymałość mechaniczną, jeżeli stopień polimeryzacji spada poniżej $n = 100$.	Materiał konstrukcyjny, stolarka okienna, skleiki drewniane, laminat drzewny

<p>Plity gipsowo-kartonowa (Norgips):</p>	<p>Plity kartonowo-gipsowe stosowane w badaniach:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ płyta GKB typu A, grubość 9,5 mm (do stosowania w pomieszczeniach, gdzie WWP < 70%) ➤ płyta GKB typu H2, grubość 12,5 mm, zawiera silikon (zwiększona hydrofobowość) oraz związki biocydowe, barwa zielona kartonu (do stosowania w pomieszczeniach, gdzie WWP < 85%) ➤ płyta GKB typu DFH2, grubość 12,5 mm, zawiera silikon (zwiększona hydrofobowość) oraz związki biocydowe, barwa zielona kartonu (do stosowania w pomieszczeniach, gdzie WWP < 85%), zwiększona odporność przeciwoogniowa. <p>Rdzeń gipsowy obłożony obustronnie kartonem. Karton jest zwykle wytwarzany z makułatury. Gips pochodzi ze złóż naturalnych albo z instalacji do odsiarczania gazów spalinyowych. Plity impregnowane zawierają domieszkę związków silikonowych, nadających im właściwości hydrofobowe oraz substancji grzybobójczych. Różne rodzaje płyt charakteryzują się nasiąkliwością wody od 5 do 25%</p>	<p>Ścianki działowe, okładziny konstrukcji</p>
<p>Tapeta (<i>Ergis</i>)</p>	<p>Tapeta papierowa stosowana w badaniach: wyłaczana, barwiona, bez warstwy klejącej i powłoki polimerowej. Rodzaje tapet: papierowe (celuloza wraz z dodatkami, np. barwniki), winylowe, tekstylne (włókna naturalne: jedwab, len, bawełna, oraz syntetyczne: poliestrowe, wiskozowe, polipropylenowe). Zarówno na tapetach winylowych, jak i tekstylnych podłożem jest papier. Łatwo wchłania wodę (najlepiej – tapety papierowe, winylowe – najstabiliej). Wilgotność podłoża pod tapetą nie powinna przekraczać 2-4%, w zależności od rodzaju podłoża.</p>	<p>Materiał wykończeniowy</p>
<p>Powłoka emulsyjna (<i>Polifarb</i>)</p>	<p>Farba emulsyjna stosowana w badaniach: Polinak + 30% bieli, rozcieńczalnik – woda, wytwarzana wg normy ZN-PCW 20001: 1991.</p> <p>Materiały chemiczne obojętne (pH około 7-8). Współczynnik zwilżalności 0,1 do 0,5 kg/m²/godz.; współczynnik przepuszczalności pary wodnej – zależnie od spotwa: 0,1 do 1,0 m.</p>	<p>Malowanie elewacji i wnętrz</p>
<p>Skóra naturalna i syntetyczna</p>	<p>Skóra naturalna stosowana w badaniach: bydlęca, garbowana, barwiona, barwa-brąz</p> <p>Skład skóry naturalnej wyprawionej: keratyna, kolagen, białka globularne związki tłuszczowe, mineralne, cukry, woda 14-20%. Wysoka adsorpcja wody (do 50%).</p> <p>Skóra syntetyczna (ską) stosowana w badaniach: skóra tapicerska barwiona (czarna), tkanina poliestrowa pokryta warstwą polichloru winylu. Skóra syntetyczna nie przepuszcza pary wodnej, wysoka hydrofobowość.</p>	<p>Materiał tapicerski, do wyrobu mebli</p>
<p>Wykładzina dywanowa (<i>Komifort</i>)</p>	<p>Wykładzina dywanowa zawierająca włókna mieszanne: wełna, poliamid, polipropylen; warstwa spodnia – tworzywo sztuczne; wykładzina pluszowa, jednobarwna.</p>	<p>Materiał wykończeniowy (podłogi)</p>
<p>Wykładzina PCV (<i>Polyflor</i>)</p>	<p>Wykładzina PCV stosowana w badaniach: polichlorek winylu i poliuretan, jednowarstwowa, jednobarwna, grubość 1,5 mm</p> <p>Duża elastyczność, wytrzymałość mechaniczna (największa PCV), odporność na ścieranie. W zależności od rodzaju wykładziny – różna chłonność wody (największa w naturalnych, najmniej w sztucznych (nasiąkliwość PCV po 24 godz. – nie więcej niż 1%).</p>	

3.6.3. Identyfikacja grzybów strzępkowych

Szczepy grzybów hodowano na pożywce Czapka w temperaturze 25°C, w czasie 7-10 dni. Identyfikację do gatunków przeprowadzono w oparciu o klucze diagnostyczne (Fassatiowa, 1983; Samson i in., 2000; Flannigan i in., 2001a; Frisvad i Samson, 2004).

3.7. Oznaczanie ergosterolu

Ergosterol oznaczano w powietrzu wewnętrznym i atmosferycznym oraz na przegrodach budowlanych i w próbach materiałów budowlanych.

3.7.1. W powietrzu

Próbki do analizy pobierano metodą filtracji, wykorzystując próbnik do poboru powietrza Impactor Fb5 (*Klotz*, Niemcy) oraz filtr żelatynowy (*Sartorius*, wielkość porów 2 µm). Objętość pobieranego powietrza wynosiła 1000 l. Po pobraniu próbki powietrza filtr umieszczano w 50 ml metanolu (cz.d.a, *POCH*) i ekstrahowano ergosterol, stosując wytrząsanie przez 30 minut przy 150 obrotach/min. Uzyskany roztwór zlewno do kolby (500 ml) ze szlifem i dodawano 5 ml 1M metanolewego roztworu KOH (cz.d.a, *POCH*), całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut od momentu wrzenia. Następnie próbkę schładzano do temperatury 4°C i przeprowadzono dwukrotną ekstrakcję przez 2 minuty heksanem (cz.d.a, *POCH*) w ilości 50 ml. Oddzielano górną warstwę heksanową i odparowywano rozpuszczalnik do sucha w wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczano w 30 ml metanolu. Absorbancję tak przygotowanych próbek odczytywano przy długości fali $\lambda = 282,6$ nm (spektrofotometr DU 640 *Beckman*, Niemcy). Stężenie ergosterolu obliczano z krzywej wzorcowej (Gutarowska, 1999), wykorzystując wzorzec ergosterolu (*Sigma*). Wyniki podawano w µg/m³.

3.7.2. Na przegrodach budowlanych

Próbki do analizy ergosterolu z powierzchni przegród budowlanych (100 cm² powierzchni) pobierano metodą wymazu do 50 ml metanolu. Ekstrakcję ergosterolu prowadzono analogicznie, jak opisano powyżej. Wyniki podawano w µg ergosterolu/100 cm².

3.7.3. Na materiałach budowlanych porażonych przez grzyby strzępkowe

Próbki materiałów budowlanych porażonych pleśniami (pobranych z mieszkań oraz uzyskanych podczas hodowli laboratoryjnych) pasteryzowano (temperatura 85 °C, czas 30 min), dezintegrowano do fragmentów o średnicy mniejszej niż 0,2 mm

lub cięto na małe fragmenty o powierzchni mniejszej niż 2,75 mm². Następnie próbki materiałów ważono i zawieszano w 100 ml metanolu i wytrząsano w warunkach opisanych powyżej (p. 3.7.1). Po wstępnej ekstrakcji, roztwór metanolowy odwirowano (RCF = 910×g, 10 min) w celu usunięcia materiału budowlanego. Dalszy tok postępowania był identyczny jak przy oznaczaniu ergosterolu w powietrzu. Wyniki podawano w µg ergosterolu/g materiału.

3.8. Hodowle laboratoryjne grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych

3.8.1. Przygotowanie zawiesiny zarodników grzybów strzępkowych

Zarodniki pleśni zmywano ze skosów MEA za pomocą sterylnej soli fizjologicznej (0,85%) z dodatkiem kilku kropli Tween (cz.d.a, *POCH*). Uzyskaną zawiesinę mieszano na mieszadle magnetycznym przez 15 min, w celu rozbicia aglomeratów zarodników. Gęstość inokulum oznaczano metodą rozcieńczeń. Hodowle prowadzono na pożywce MEA w temperaturze 25°C, przez 7 dni. Gęstość zawiesin kształtowała się w zakresie 2×10^6 – 4×10^6 jtk/ml.

3.8.2. Przygotowanie materiałów budowlanych do badań

Materiały budowlane przygotowywano zgodnie z zaleceniami producenta (zawartość wody w gipsie, zaprawie, cemencie). Cement, gips oraz zaprawę formowano w prostopadłościany o wymiarach: 40×40×5 mm (szerokość, długość, wysokość). Tapetę, skórę, skaj, wykładzinę dywanową, wykładzinę PCV, drewno, płyty kartonowo-gipsowe pocięto na fragmenty o wymiarach 40×45 mm. Przed przystąpieniem do hodowli pleśni, oznaczano zawartość ergosterolu w próbkach czystych materiałów – w celu ustalenia wyjściowego stopnia zanieczyszczenia materiałów. Wszystkie materiały poddawano naświetlaniu lampą UV przez 24 godziny (z każdej strony materiału), co eliminowało ergosterol z próbek (ergosterol ulega przekształceniu do witaminy D₂). Czystość mikrobiologiczną materiałów sprawdzano metodą hodowlaną na pożywce MEA, w temperaturze 25°C, po 7 dniach inkubacji.

3.8.3. Hodowle grzybów strzępkowych

Do próbek materiałów budowlanych (o masie od 0,4 do 22 g, w zależności od rodzaju materiału) dodawano po 1 ml zawiesiny zarodników pleśni, 1 ml odpowiedniej pożywki (w zależności od prowadzonej hodowli i celu badań – Tabela 9) oraz sterylną wodę destylowaną do uzyskania odpowiedniego poziomu wilgotności masowej (Tabela 10). Następnie próbki inkubowano w temperaturze

25°C, w czasie od 21 do 41 dni, w zależności od celu prowadzonych eksperymentów. W kolejnych dniach inkubacji oznaczano zawartość ergosterolu, cytotoksyczność ogólną, genotoksyczność, a także ilość oraz rodzaje mikotoksyn i białek alergennych. Do każdego rodzaju analizy przygotowywano odrębne próbki materiałów budowlanych porośniętych przez pleśń.

3.9. Oznaczanie mikotoksyn

Mikotoksyny oznaczano w wymazach pobranych z przegród budowlanych w budynkach mieszkalnych oraz w pożywkach mikrobiologicznych i materiałach budowlanych porośniętych grzybnia pleśni. Analizę obecności i ilości mikotoksyn prowadzono metodami: chromatografii cienkowarstwowej (TLC), immunoenzymatyczną Elisa, wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii masowej (HPLC-MS/MS).

3.9.1. Metoda chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Przygotowanie próbek do analizy:

– **z przegród budowlanych:** metodą wymazu z powierzchni 100 cm² do 25 ml mieszaniny metanol:chloroform (cz.d.a., *POCH*) 2:1; następnie próbki poddawano ekstrakcji przez 15 minut (wyrząsanie);

– **z pożywki YES:** po 7 dniach inkubacji pleśni w temperaturze 25°C; następnie próbki pożywki porośniętej grzybnia pobrano korkoborem (średnica 0,5 cm) według Filtenborg i in. (1996) do 25 ml mieszaniny TEF – toluen: octan etylu: kwas mrówkowy (cz.d.a., *POCH*) 5:4:1 i ekstrahowano mikotoksyny przez 15 minut;

– **z hodowli *A. versicolor* na materiałach budowlanych i pożywce MEA** (oznaczanie sterigmatocystyny); próbki pleśni wraz z pożywką mikrobiologiczną pobierano jak opisano powyżej, do 25 ml mieszaniny metanol : chloroform (2:1), natomiast materiały budowlane po rozdrobnieniu (warunki jak przy ekstrakcji ergosterolu – p. 3.7.3) zawieszano w 50 ml mieszaniny metanol : chloroform (2:1), a następnie próbki poddano ekstrakcji przez 15 minut (wyrząsanie).

Oznaczanie: wyekstrahowane mikotoksyny rozdzielano na aluminiowych płytkach pokrytych żelą krzemionkowym 60 (*Merck*). Na płytce nanoszono 1,5 µl badanych ekstraktów oraz roztwory standardów mikotoksyn (*Sigma*) (aflatoksyna B₁ – 100 µg/ml metanolu, ochratoksyna A – 200 µg/ml etanolu, sterigmatocystyna – 20 µg/ml metanolu). Po rozwinięciu w mieszaninie rozpuszczalników TEF, chromatogramy suszono w temperaturze 130°C przez 5 min. i obserwowano w świetle UV (360 nm). W przypadku sterigmatocystyny – obserwacje wykonano po wywołaniu 20% roztworem etanolem AlCl₃ (cz.d.a., *POCH*). Porównując

wartości współczynnika R_f (Singh i in, 1991) oraz zabarwienie powstałych badanych plam ze wzorcami, dokonano identyfikacji wytwarzanych mikotoksyn.

Czułość wykrywania metodą TLC sterigmatocystyny wynosi 20 ng, ochratoksyny – 5 ng, aflatoksyny B₁ – 0,1 ng (Chełkowski, 1985).

W pracy stosowano skalę ilościową obecności sterigmatocystyny (ng/próbkę) w próbce chromatogramu na zasadzie porównania intensywności zabarwienia ze standardem:

- (–) brak < 20 ng sterigmatocystyny,
- (+) stężenie sterigmatocystyny niskie, 20-50 ng,
- (++) stężenie sterigmatocystyny średnie, 50-100 ng,
- (+++)

stężenie sterigmatocystyny wysokie >100 ng.

3.9.2. Metoda immunoenzymatyczna Elisa

Ilości ochratoksyny A oraz aflatoksyny B₁ wytworzonych przez pleśń *A. ochraceus* NRLL 3174 oraz *A.flavus* KA 30 na materiałach budowlanych i pożywcze MEA wraz z grzybnią oznaczono metodą Elisa.

Przygotowanie próbek do analizy: próbki po pasteryzacji i dezintegracji wysuszono do stałej masy, a następnie zawieszono w 100 ml 70% roztworu wodnego metanolu i ekstrahowano przez 15 minut (wytrząsanie). Po ekstrakcji roztwór metanolowy odwirowano (RCF = 910×g, 10 min) w celu usunięcia materiału budowlanego i/lub pożywki i poddano analizie metodą immunoenzymatyczną Elisa (ochratoksyna A). W przypadku oznaczania aflatoksyny B₁ (po ekstrakcji roztworem metanolu) – do 2 ml uzyskanego roztworu dodawano 2 ml wody destylowanej oraz 3 ml dichlorometanu (cz.d.a., *POCH*) i całość mieszano przez 5 min. Następnie próbki odwirowano (RCF = 910×g, 10 min), usuwano górną fazę wodną, a dolną fazę dichlorometanową odparowano, po czym dodawano mieszaninę metanolu, wody destylowanej i n-heptanu (1:1:1,5) (cz.d.a., *POCH*) i całość mieszano 5 min. Następnie próbki wirowano (RCF = 910×g, 10 min), górną warstwę n-heptanu usuwano, dolną stosowano bezpośrednio w teście.

Oznaczanie: do analizy mikotoksyn wykorzystano testy firmy *AgraQuant* (czułość metody: 2-40 ppb) oparte na metodzie immunoenzymatycznej Elisa. Odczytów absorbancji badanych próbek dokonano w spektrofotometrze płytkowym UV M 340 (*Biogenet*) przy długości fali $\lambda = 450$ nm, korzystając z krzywej wzorcowej wyznaczonej dla standardów mikotoksyn o określonych stężeniach (w zestawie testu). Wyniki badania stężenia mikotoksyn w próbce materiału przedstawiono w jednostkach ppb (inaczej: $\mu\text{g/kg}$ materiału).

3.9.3. Metoda HPLC – MS/MS

Identyfikację i oznaczanie ilości mikotoksyn wytworzonych przez pleśń na płycie gipsowo-kartonowej, zaprawie tynkarskiej oraz na podłożu laboratoryjnym MEA wykonano metodą HPLC-MS/MS (Sulyok i in., 2007).

Przygotowanie próbek do analizy: próbki materiałów budowlanych oraz pożywkę wraz z grzybnia pleśni, po pasteryzacji i dezintegracji wysuszono do stałej masy, a następnie ekstrahowano przez 90 minut, stosując wytrząsanie w mieszaninie acetonitryl : woda : kwas octowy (20:79:1) w proporcji 1 g materiału:4 ml mieszaniny. Po oddzieleniu roztworu od materiałów budowlanych/podłoża przez wirowanie ($RCF = 910 \times g$, 10 min), ekstrakt rozcieńczano w mieszaninie acetonitryl:woda:kwas octowy (20:79:1) i poddawano analizie chromatograficznej.

Oznaczanie: do rozdzielu chromatograficznego wykorzystywano system 1100 HPLC (*Agilent, Waldbronn*, Niemcy) z kolumną Gemini® C18, 150×4.6 mm (długość \times średnica wewnętrzna) (*Phenomenex, Torrance, US*). Do określenia rodzaju mikotoksyn oraz ich ilości wykorzystywano aparat QTrap 4000 ESI-MS/MS (*Applied Biosystems, CA, USA*). Wykonano również oznaczenia mikotoksyn w próbkach czystych materiałów budowlanych oraz w sterylnym podłożu MEA. Wyniki badania ilości mikotoksyn wyrażano w $\mu g/kg$ materiału.

3.10. Oznaczanie cytotoksyczności ogólnej

Cytotoksyczność ogólną oznaczono w próbkach wymazów z przegród budowlanych oraz w ekstraktach z materiałów budowlanych porośniętych badanymi pleśniami. Dodatkowo próbki kontrolne stanowiły standardy aflatoksyny B₁ oraz sterigmatocystyny (opisane w p. 3.9.1). Oznaczono również cytotoksyczność czystych materiałów budowlanych oraz sterylnej pożywki MEA.

Przygotowanie próbek do analizy:

– **z powierzchni przegród budowlanych:** próbki pobierano metodą wymazu z powierzchni 100 cm^2 do objętości 10 ml buforu PBS (skład: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,55 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,85 g, NaCl – 9,0 g, Tween 80 – 1ml, woda destylowana – 1000 ml, pH $7,4 \pm 0,2$; odczynniki cz.d.a. *POCH*) i zawiesinę poddawano homogenizacji (*Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, USA*). Warunki przeprowadzonej homogenizacji: czas – 7 min, częstotliwość – 60 kHz, temperatura 4°C. Homogenizacja miała na celu rozbicie komórek i uwolnienie do roztworu toksycznych metabolitów. Następnie roztwór przefiltrowano, wykorzystując filtr strzykawkowy (*Sartorius*, średnica por $2 \mu\text{m}$) w celu usunięcia komórek zdeintegrowanych lub pozostałych żywych organizmów, które mogłyby zakłócać analizę w hodowli tkankowej;

– z **materiałów budowlanych oraz pożywki** wraz z grzybnią pleśni, po pasteryzacji zalewano 50 ml PBS, następnie poddawano homogenizacji i filtracji w warunkach opisanych powyżej.

Oznaczenie: Cytotoksyczność ogólną oznaczano testem MTT (redukcja soli tetrazolowej bromku 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolowego, odczynnik *Sigma*) lub XTT (redukcja soli sodowej 3'-(1(fenyloaminokarbonylo)-3,4-tetrazolio)-bis (4-metoksy-6-nitro) benzeno-sulfonowego kwasu, odczynnik *Sigma*).

Analizy dokonano metodą *in vitro* na komórkach linii fibroblastów mysich 3T3-L1 (ATCC CL-173, gęstość komórek 9×10^3 /ml). Badanie zostało wykonane zgodnie z zaleceniami Polskiej Normy PN-EN ISO 10993-5 (Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności *in vitro*). We wstępnym etapie badań zastosowano test MTT, jednak z uwagi na trudności związane z dezintegracją komórek (nie mającej wpływu na odczyty) w kolejnej części badań zastosowano test XTT. Wyniki obu testów są w pełni porównywalne. Komórki fibroblastów mysich hodowano na podłożu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium z L-glutaminą, glukozą, NaHCO_3 ; *Invitrogen*) z dodatkiem surowicy płodowej bydlęcej 10%, 4 mM L-glutaminy, 100 $\mu\text{l/ml}$ streptomycyny, 100 U/ml penicyliny (*Invitrogen*). Komórki fibroblastów wraz z badanymi ekstraktami inkubowano w czasie 24 godzin (test MTT) lub 72 godzin (test XTT) w temperaturze 37°C, w inkubatorze CO_2 (wilgotność 80%, zawartość CO_2 – 5%). Próbkę kontrolną ujemną stanowiła hodowla komórek fibroblastów mysich z dodatkiem buforu PBS. Po inkubacji do próbek dodano roztwór MTT o stężeniu 0,5 mg/ml lub XTT o stężeniu 0,3 mg/ml i inkubowano przez 3 godziny, a następnie usunięto roztwór MTT (XTT) i dodawano roztworu DMSO (dimetylosulfotlenek, *Sigma*) o stężeniu 0,001%, w celu zniszczenia błon komórkowych oraz rozpuszczenia powstałego formazanu. Następnie wykonano pomiar absorbancji za pomocą spektrofotometru płytkowego UV M 340 (*Biogenet*) (długość fali $\lambda = 550 \text{ nm}$ – test MTT lub $\lambda = 450 \text{ nm}$ – test XTT). W przypadku oznaczania cytotoksyczności standardów mikotoksyn, wyznaczono wartość stężenia hamującego IC_{50} , które podano w $\mu\text{g/ml}$.

W celu porównania cytotoksyczności próbek badanych ekstraktów z próbkami standardów aflatoksyny i sterigmatocystyny, wprowadzono skalę:

- (+++)
 - (++)
 - (+)
 - (–)
- | |
|---|
| wysoka cytotoksyczność, porównywalna do standardów, |
| $\text{IC}_{50} = 6,6 - 20 \mu\text{g/ml}$, |
| średnia cytotoksyczność, $\text{IC}_{50} = 20 - 100 \mu\text{g/ml}$, |
| niska cytotoksyczność, $\text{IC}_{50} = 100 - 200 \mu\text{g/ml}$, |
| brak efektu cytotoksycznego, $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$. |

3.11. Oznaczanie genotoksyczności

Genotoksyczność oznaczano dla wymazów pobranych ze ścian zagrzybionych budynków oraz ekstraktów z materiałów budowlanych i podłoża MEA.

Przygotowanie próbek do analizy: próbki pobierano analogicznie, jak przy oznaczaniu cytotoksyczności ogólnej (p. 3.10), a następnie liofilizowano w celu zagęszczenia ekstraktów. Liofilizację prowadzono w liofilizatorze Lyph Lock-12 (*Labconco*) w warunkach: temperatura kondensora -50°C , ciśnienie 2 Pa, czas suszenia 24 godz.

Oznaczanie genotoksyczności wykonano metodą MLA zgodnie z procedurą OECD TG 476 (OECD Guideline 476, 1997). Test przeprowadzano w dwóch wariantach – z komórkami aktywnymi i nieaktywnymi metabolicznie. Aktywność metaboliczną komórek indukowano poprzez dodanie do mysich komórek chłoniaka (L5178Y TK+/-; ATCC CRL9518) mieszaniny *S9 mix* zawierającej homogenat wątroby szczura, Aroclor, glukozo-6-fosforan, NADP, KCl (odczynniki *Sigma*, komórki wątroby szczura – IMP w Łodzi; procedura wg Ames i in., 1975). Do hodowli mysich komórek chłoniaka wykorzystywano podłoże RPMI 1640 z dodatkiem L-glutaminy, penicyliny, streptomycyny, pirogromianu sodu oraz 10% inaktywowanej termicznie surowicy końskiej (*Gibco BRL*). Test MLA obejmował kilka etapów: ekspozycję z badanymi ekstraktami, pomiar przeżywalności komórek, ekspresję cechy (czas zajścia mutacji), dodatek czynnika cytotoksycznego, pomiar częstotliwości mutacji. W pierwszym etapie mysie komórki chłoniaka inkubowano przez 3 godziny (komórki aktywne i nieaktywne metabolicznie) oraz przez 24 godziny (komórki nieaktywne metabolicznie) z próbkami ekstraktów. Kontrolę ujemną stanowiła mieszanina zawierająca PBS, podłoże wzrostowe R0 (*Gibco BRL*) oraz 0,001% DMSO. Dodatnią kontrolę stanowiły roztwory mutagenów (B(a)P benzopiren, *Sigma*) oraz mieszanina *S9 mix* (dla komórek aktywnych metabolicznie) lub MMS (metanosulfonian metylu, *Sigma*) z dodatkiem KCl (cz.d.a., *POCH*) dla komórek nieaktywnych metabolicznie. Po inkubacji sprawdzano przeżywalność komórek podczas hodowli w podłożu wzrostowym, w temperaturze 37°C , atmosfera 5% CO_2 , czas 11–13 dni. Komórki poddane działaniu potencjalnych mutagenów (ekstrakty) lub mutagenów w próbkach kontrolnych po 3 dniowej ekspresji (czas, po którym uwidoczni się mutacja) poddano działaniu czynnika cytotoksycznego – TFT (trifluorotymidyny, *Sigma*). Po tym czasie prowadzono inkubację w warunkach jak opisano powyżej i następnie sprawdzano częstość mutacji komórek metodą mikroskopową. Określano liczbę komórek mutantów zdolnych do proliferacji. Częstość mutacji wyrażano jako odsetek (%) liczby komórek TFT opornych z całkowitej liczby komórek (1×10^6). Jeżeli liczba mutantów była większa niż 50% komórek, próbkę uznawano za

genotoksyczną (Clements, 2000). Jednocześnie przeprowadzono oznaczanie genotoksyczności roztworów aflatoksyny i sterigmatocystyny.

3.12. Badania mieszkańców

Badania lekarskie obejmowały: badanie ankietowe, punktowe testy skórne SPT (Skin Prick Test) oraz oznaczanie antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE oraz klasy asIgE w surowicy krwi użytkowników pomieszczeń zagrzybionych oraz kontrolnych.

3.12.1. Kwestionariusz wywiadu lekarskiego

Ankieta zawierała pytania o objawy:

- **alergii:** kaszel, duszność, nieżyt nosa (katar), swędzenie i objawy ze strony spojówek, swędzące wykwity skórne, obrzęki;
- **dolegliwości związane z SBS:** bóle głowy, zaburzenia snu, koncentracji, ogólne osłabienie, nadmierne pocenie, uczucie zmęczenia, rozdrażnienie, bóle gardła, bóle w okolicy serca, podrażnienia skóry, podrażnienie błon śluzowych nosa, oczu, gardła.

3.12.2. Punktowe testy skórne

Punktowe testy skórne (SPT) wykonywano na przyśrodkowej powierzchni przedramienia, stosując zestaw pospolitych alergenów środowiska (*Allergopharma*, Germany), takich jak roztocze kurzu domowego (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*), pierze, pyłki traw, drzew, chwasty, a także zestaw alergenów grzybów pleśniowych: *Alternaria alternata* (dawniej *A. tenuis*), *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides* (dawniej *F. moniliforme*), *Helminthosporium halodes*, *Mucor mucedo*, *Penicillium chrysogenum* (dawniej *P. notatum*), *Aureobasidium pullulans* (dawniej *Pullularia pullulans*), *Rhizopus nigricans*, *Phoma betae*, *Alternaria mix*, *Aspergillus mix*, *Cladosporium mix*, *Penicillium mix*, oraz drożdży *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i grzybów wyższych *Neurospora sitophila*, *Serpula lacrymans*, *Curvularia lunata*, *Ustilago tritici*. Kontrolę negatywną stanowił roztwór buforu glicerynowego stosowany do zawieszania alergenów, a kontrolę pozytywną roztwór chlorowodorku histaminy w stężeniu 1 mg/ml. Zgodnie z zaleceniami Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej wyniki testów oceniano po 15 minutach – za wynik dodatni uważano bąbel o średnicy większej o 3 mm od kontroli ujemnej. Żadna z badanych osób nie przyjmowała leków antyhistaminowych.

3.12.3. Oznaczanie antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE oraz klasy asIgE w surowicy krwi

Od badanych osób pobrano krew do oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgE w surowicy oraz specyficznych przeciwciał asIgE, skierowanych przeciwko alergenom grzybów pleśniowych. Oznaczenia zostały wykonane z użyciem zestawów Uni-CAP (*Uppsala, Pharmacia Diagnostics, Szwecja*). Za podwyższony poziom przeciwciał klasy IgE uznawano stężenia powyżej 100 KU/l. Do oznaczania poziomu przeciwciał asIgE przeciwko alergenom poliwalentnym wykorzystano mieszaninę alergenów mx2: *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Helminthosporium halo des.* Dodatkowo, u osób z dodatnimi wynikami testów skórnych z grzybami pleśniowymi lub dodatnim wynikiem z alergenami mx2 oznaczano poziomy specyficznych przeciwciał IgE z monowalentnymi antygenami *Penicillium chrysogenum* (m1), *Aspergillus fumigatus* (m3), *Alternaria alternata* (m6). Oznaczenia wykonano immunoenzymatyczną metodą Elisa (Uni-CAP, Pharmacia, Szwecja). Za pozytywną reakcję przyjęto stężenie przeciwciał 0,35 KU/l.

3.13. Oznaczanie w surowicy krwi przeciwciał przeciwko alergenom pleśni obecnym w budynkach

Oznaczenie w surowicy krwi przeciwciał przeciwko alergenom pleśni wyizolowanych w budynkach mieszkalnych wykonano u czterech mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń, u których stwierdzono objawy alergiczne, wysoki poziom przeciwciał IgE, potwierdzoną alergię na pleśń na podstawie testów skórnych oraz testów z surowicy krwi z poliwalentnymi i monowalentnymi antygenami, wykonanych metodą Elisa.

Pierwszy etap badań obejmował hodowlę wybranych gatunków pleśni dominujących w mieszkaniach osób uczulonych. Hodowlę prowadzono na materiałach budowlanych oraz w podłożu Mo według opisanej wcześniej procedury (p. 3.8). Następnie z próbek materiałów budowlanych porośniętych grzybnią lub podłoża MEA ekstrahowano białka (p. 3.14). Białka rozdzielono metodą elektroforezy SDS-PAGE (p. 3.15) i przeprowadzono oznaczanie antygenów białkowych reagujących z surowicą krwi osób uczulonych, stosując metodę immunoblotting (p. 3.16). Dla każdej próbki wykonano dwa oznaczenia: jeden rozdział elektroforetyczny przeznaczono do barwienia i oznaczenia masy cząsteczkowej białek (p. 3.15), a drugi wykorzystywano do reakcji immunologicznej z surowicą. W ten sposób oznaczono alergenność białek o znanej masie cząsteczkowej, reagujących z surowicą osoby uczulonej.

3.14. Ekstrakcja białek alergennych pleśni

Próbki materiałów budowlanych (tapeta, płyta gipsowo-kartonowa, gips, zaprawa) oraz pożywek kontrolnych: Mo (z ekstraktem drożdżowym) oraz MEA, porośnięte pleśniami, zawieszano w 20 ml buforu PBS (KH_2PO_4 , 0,2 g; Na_2HPO_4 , 1,2 g; NaCl, 8 g; KCl, 0,2 g; woda destylowana 1000 ml; pH $7,4 \pm 0,2$; odczynniki cz.d.a., *POCH*). Do próbek dodawano 4 g kulek szklanych o średnicy 1 mm i wytrząsano w temperaturze 4°C przez 16 godzin.

Następnie próbki były dezintegrowane w homogenizatorze ultradźwiękowym przy częstotliwości 60 kHz (p. 3.10) w temperaturze 4°C , przez 5 minut. Próbki odwirowano ($\text{RCF} = 12500 \times g$, 10 min, temperatura 4°C), supernatant z białkami przefiltrowano (*Sartorius* $0,2 \mu\text{m}$) i wytrącano białka z roztworu przez dodanie 96% etanolu (cz.d.a., *POCH*) w proporcji 1:1. Roztwory z zawiesiną przechowywano w temperaturze -20°C przez 12 godzin. Próbki rozmrażano, następnie usuwano supernatant, a precypitat suszono i rozpuszczano w 1ml buforu próbkowego zawierającego 0,5 M Tris – HCl, pH $6,8 \pm 0,2$; 20% SDS; glicerol, 10 ml; β -merkaptoetanol, 5 ml; woda destylowana, 50 ml; barwnik – błękit bromofenolowy; odczynniki cz.d.a.; *Sigma*, *POCH*). Próbki gotowano w łaźni wodnej (100°C , 5 min), schładzano, mrożono i przechowywano w temperaturze -20°C .

3.15. Elektroforeza SDS-PAGE

Rozdział białek obecnych w ekstraktach otrzymanych z grzybni rosnącej na materiałach budowlanych oraz podłożu kontrolnym wykonano metodą elektroforezy SDS-PAGE (Laemmli, 1970; Benndorf i in., 2008). Próbki ekstraktów białkowych ($40 \mu\text{l}$) rozpuszczano w buforze próbkowym (skład p. 3.14). Elektroforezę prowadzono przy natężeniu prądu 30 mA przez 5 godzin. Po zakończonym rozdziale białek, żel przechowywano w 50% roztworze wodnym TCA (kwasu tróchlorooctowego), w temperaturze pokojowej, przez 30 minut, następnie przepłukiwano wodą destylowaną i barwiono barwnikiem Coomassie Brilliant Blue – błękit Coomassie (skład: Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,25g; kwas octowy, 10 ml; metanol, 45 ml; woda destylowana, 45 ml) przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodawano roztwór odbarwiający (metanol, 100 ml; kwas octowy, 70 ml; woda destylowana 1000 ml) i płukano aż do odbarwienia matrycy żelu. Wybarwiony żel skanowano, a otrzymany obraz w postaci pliku graficznego analizowano za pomocą programu komputerowego Sigma-Gel (*Jandel-Scientific*). Masy cząsteczkowe białek oznaczano wykorzystując marker białek standardowych (białka o masach cząsteczkowych Mcz od 6,5 do

200 kDa). Marker rozpuszczano w 100 μ l wody dejonizowanej. Do analizy stosowano odczynniki chemiczne cz.d.a., *Sigma*.

3.16. Immunoblotting

Rozdzielone białka (p. 3.15) były przenoszone z żelu na membranę z nitrocelulozy techniką elektroblottingu, stosując bibułę filtracyjną (*Schleicher and Schuell*) i bufor do przenoszenia – transferu (Trizma Base, 0,5 g; glicyna, 14,4 g; metanol, 100 ml; woda destylowana do 1000 ml; pH, $8,3 \pm 0,2$). Transfer przeprowadzano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej przy stałym napięciu 20 V.

Następnie do membrany nitrocelulozowej dodawano 3% bufor blokujący zawierający odtłuszczone mleko krowie w proszku, 3 g; KH_2PO_4 , 0,3 g; Na_2HPO_4 , 5,7 g; NaCl, 9 g; Tween-20, 1ml; woda destylowana do 1000 ml; pH $7,2 \pm 0,2$; mleko – sprzedaż detaliczna) i mieszano przez 2 godziny, w temperaturze pokojowej. Membrana nitrocelulozowa była płukana czterokrotnie w PBS (KH_2PO_4 , 0,3 g; Na_2HPO_4 , 5,7 g; NaCl, 9 g; Tween-20, 1 ml; woda destylowana do 1000 ml; pH $7,2 \pm 0,2$) przez 3 minuty.

W celu wykrycia reakcji immunologicznej (antygen-przeciwciało), membrany celulozowe inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej z surowicą pacjenta rozcieńczoną w buforze PBS (1:99). Następnie membrany inkubowano przez 60 minut z koniugatem monoklonalnych mysich przeciwciał anti-human IgE z alkaliczną fosfatazą, w rozcieńczeniu 1 μ l koniugatu w 100 ml buforu PBS, i przemywano czterokrotnie roztworem PBS przez 3 minuty. Reakcję immunologiczną uwidocznilo poprzez płukanie w koniugacie 5-bromo-4-chloro-3-indolilo fosforan/błękit nitrotetrazoliowy (BCIP/NBT). Po wykryciu niebieskich prążków (reakcja między antygenem białkowym a przeciwciałem z surowicy), zatrzymywano reakcję poprzez zlanie roztworu koniugatu i płukanie w PBS. Masę cząsteczkową antygenów reagujących z surowicą oznaczano przez porównanie wybarwionego żelu elektroforetycznego z rozdzielonymi białkami o oznaczonej masie cząsteczkowej. W analizie stosowano odczynniki chemiczne cz.d.a., *Sigma*.

3.17. Obliczenia matematyczne

Zawartość mikotoksyn oraz ergosterolu podczas hodowli pleśni na materiałach budowlanych i pożywkach mikrobiologicznych oznaczano w trzech niezależnych powtórzeniach, a otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wyznaczając średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (wyniki wykazywały rozkład normalny lub zbliżony do normalnego), wartość minimalną i maksymalną. Do obliczeń wykorzystano program komputerowy *Excel*. Szybkość

wzrostu pleśni (S) na materiałach budowlanych obliczano na podstawie zmiany zawartości ergosterolu w poszczególnych dniach hodowli, opisaną równaniem funkcji:

$$Y = p_1 \cdot e^{\frac{X}{p_2}} + p_3 + p_4 \cdot X$$

gdzie: Y – zawartość ergosterolu (µg/g);

X – czas;

p1, p2, p3, p4 – parametry równania.

Z wykresu pochodnej wyznaczano maksymalną szybkość wzrostu S_{\max} oraz szybkość wzrostu w połowie fazy logarytmicznego wzrostu $S_{1/2\log}$, wykorzystując program komputerowy *Origin* 6.1.

Badania laboratoryjne wykonano w różnych specjalistycznych laboratoriach badawczych.

W Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ, w laboratorium mikologicznym wykonano analizę ilości i rodzaju grzybów obecnych w budynkach mieszkalnych, rodzaju mikotoksyn tworzonych na przegrodach budowlanych metodą TLC, prowadzono hodowlę pleśni na materiałach budowlanych oraz oznaczanie wzrostu mierzone zawartością ergosterolu i mikotoksyn metodą Elisa (ochratoksyny, aflatoksyny, sterigmatocystyny), a także ilości i rodzaju białek alergennych syntetyzowanych na materiałach budowlanych oraz identyfikacji białek alergennych, które reagowały z przeciwciałami obecnymi w surowicy krwi mieszkańców metodą Immunoblottingu.

W laboratorium Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Applied Life Sciences w Tulln (Austria) wykonano metodą HPLC-MS/MS analizę mikotoksyn wytwarzanych przez pleśnie na materiałach budowlanych i pożywkach.

Ocenę zdrowia mieszkańców (badanie ankietowe, punktowe testy skórne, oznaczanie antygenowo – swoistych przeciwciał klasy IgE oraz klasy asIgE w surowicy krwi mieszkańców) przeprowadzono wspólnie z lekarzem specjalistą alergologiem z Zakładu Chorób Zawodowych i Toksykologii, Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi (Zgoda Komisji Etyki Lekarskiej na przeprowadzenie badań na ludziach).

Badania cytotoksyczności i genotoksyczności przeprowadzono w Pracowni Toksykologii Molekularnej Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi.

4. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

4.1. Badania środowiskowe

4.1.1. Charakterystyka pomieszczeń mieszkalnych i analiza przyczyn zagrzybienia

Oceniono łącznie 142 pomieszczenia mieszkalne z objawami oraz bez objawów zagrzybienia (opis budynków – metodyka p. 3.1). Ankieta obejmowała pytania o miejsca zagrzybienia, wentylację, sposób ogrzewania, rodzaj stolarki okiennej. W pomieszczeniach mierzono temperaturę i wilgotność powietrza wewnętrznego. Uzyskane dane (Tabela 12) umożliwiły porównanie pomieszczeń zagrzybionych i kontrolnych oraz pozwoliły na wskazanie głównych przyczyn zagrzybienia.

Tabela 12. Charakterystyka badanych pomieszczeń mieszkalnych

Ankietowana/mierzona cecha związana z pomieszczeniem	Pomieszczenia zagrzybione (częstość, %) Liczba pomieszczeń: N = 72	Pomieszczenia bez zagrzybienia (częstość, %) Liczba pomieszczeń: N = 70
Rodzaj badanych pomieszczeń:		
Pokój dzienny (N = 37)	18 (25%)	19 (27,1%)
Sypialnia (N = 26)	12 (16,7%)	14 (20%)
Kuchnia (N = 29)	16 (22,2%)	13 (18,6%)
Łazienka (N = 33)	18 (25%)	15 (21,4%)
Przedpokój (N = 17)	8 (11,1%)	9 (12,9%)
Rodzaj stolarki okiennej:		
Stara, drewniana	50 (69,4%)	36 (51,4%)
Nowa, drewniana	3 (4,2%)	5 (7,1%)
Nowa, PCV, szczelna	13 (18,1%)	5 (7,1%)
Nowa, PCV, z rozszczelnieniem	6 (8,3%)	24 (34,4%)
Ogrzewanie:		
– grzejnikiem elektrycznym	33 (45,8%)	6 (8,5%)
– grzejnikiem naftowym	11 (15,2%)	–
– piecem węglowym	36 (50%)	6 (8,5%)
– centralne ogrzewanie (CO)	18 (25%)	58 (82,9%)

Wentylacja Obecna Brak	32 (44,4%)		64 (91,4%)
	40 (55,6%)		6 (8,6%)
Wilgotność względna powietrza	30-50%	14 (19,4%)	52 (74,3%)
	50-60%	33 (45,9%)	18 (25,7%)
	60-70%	14 (19,4%)	–
	70-80%	11 (15,3%)	–
Temperatura powietrza	<15°C	4 (5,6%)	–
	15-20°C	32 (44,4%)	27 (38,6%)
	20-25°C	36 (50%)	43 (61,4%)
Miejsca objawów zagrzybienia:			
Naroża		50 (69,4%)	–
Ościeże okien		25 (34,7%)	
Ściany		47 (65,3%)	
Przy drzwiach		10 (9,7%)	
Za meblami		22 (30,5%)	

(–) nie występuje

Rozwój grzybów występował najczęściej w łazienkach, pokojach dziennych i kuchniach (22-25%), ale zagrzybienie obserwowano również w sypialniach i przedpokojach (11-16%). Pleśń zasiedlały głównie naroża pomieszczeń (69%), ściany (65%) oraz ościeże okien (35%); występowały zwykle w kilku miejscach. Przykładowe miejsca zagrzybienia badanych pomieszczeń przedstawiono na fotografiach 1 i 2.



Fot. 1.



Fot. 2.

Fot. 1 i 2. Miejsca występowania grzybów strzępkowych w kuchni (Fot. 1) oraz pokoju dziennym (Fot. 2) w budynku z XIX w. (kamienica w Łodzi; za zgodą mieszkańców, Fot. M. Piotrowska)

Wysoką wilgotność względną powietrza w pomieszczeniach (WWP powyżej 50%) stwierdzono w 80% mieszkań zagrzybionych. Dla porównania, w 74% mieszkań kontrolnych, bez zagrzybienia, wilgotność powietrza nie przekraczała poziomu 50%. Ponadto w pomieszczeniach kontrolnych nie notowano wilgotności powietrza powyżej 60%, podczas gdy w zagrzybionych wilgotność taka występowała w 35% pomieszczeń. Temperatura powietrza w obu rodzajach mieszkań nie różniła się znacznie, przy czym w zagrzybionych obserwowano nieco niższe temperatury ($< 20^{\circ}\text{C}$ w 50% mieszkań). W mieszkaniach kontrolnych (91% pomieszczeń) – w przeciwieństwie do zagrzybionych (56%) – wentylacja była obecna i działała sprawnie. Wysoka wilgotność powietrza w zagrzybionych pomieszczeniach mogła wynikać również z ich dogrzewania piecem węglowym (50%) i grzejnikiem naftowym (15%), które przyczyniają się do zwiększenia ilości pary wodnej w pomieszczeniach.

Dodatkowym czynnikiem powodującym wzrost wilgotności pomieszczeń zagrzybionych były szczelne okna z PCV. Zanotowano ponad dwukrotnie częstsze ich występowanie w pomieszczeniach zagrzybionych (18%) niż kontrolnych (7%).

Podsumowanie

Miejsca najczęściej zasiedlane przez grzyby strzępkowe to naroża pomieszczeń, ściany oraz ościeże okien w kuchniach, łazienkach i pokojach dziennych. Podstawowym czynnikiem warunkującym ograniczenie rozwoju pleśni na przegrodach budowlanych była wilgotność względna powietrza poniżej 60%. W pomieszczeniach bez oznak zagrzybienia nie obserwowano wilgotności względnej powietrza powyżej poziomu 60%. Wysokiej wilgotności powietrza sprzyjał brak wentylacji, ogrzewanie grzejnikiem naftowym lub piecem węglowym, szczelna stolarka okienna i obniżona temperatura pomieszczeń.

4.1.2. Rozwój grzybów strzępkowych w pomieszczeniach mieszkalnych

Wyniki badań mikologicznych w opisanych pomieszczeniach mieszkalnych, wykonanych metodą hodowlaną oraz oznaczania ergosterolu (metodyka badań p. 3.6 i 6.6.3) przedstawiono w tabelach 13 oraz 14.

Zaobserwowano istotne różnice w liczebności grzybów strzępkowych obecnych na przegrodach budowlanych w pomieszczeniach z objawami zagrzybienia oraz kontrolnych. Średnia liczba grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych w obiektach zagrzybionych wynosiła $7,8 \times 10^7$ jtk/ 100 cm^2 , natomiast w kontrolnych $3,3 \times 10^3$ jtk/ 100 cm^2 . Istotne różnice obserwowano również w liczbie pleśni w powietrzu wewnątrz budynków. W pomieszczeniach zagrzybionych liczba pleśni ($3,1 \times 10^3$ jtk/ m^3) dziesięciokrotnie przekraczała ich liczbę w powietrzu pomieszczeń kontrolnych ($2,1 \times 10^2$ jtk/ m^3). Na uwagę zasługują bardzo wysokie

wartości maksymalne zanieczyszczenia pleśniami powietrza wewnętrznego w pomieszczeniach zagrzybionych ($2,5 \times 10^4$ jtk/m³), które często przekraczały dopuszczalne normy literaturowe (2×10^2 - 5×10^2 jtk/m³) (Krzysztofik, 1992; Górny, 2004a).

Tabela 13. Zanieczyszczenie grzybami strzępkowymi przegród budowlanych, powietrza wewnętrznego pomieszczeń oraz powietrza atmosferycznego

Oznaczenia		Budynki zagrzybione, liczba badanych pomieszczeń, N = 72	Budynki bez zagrzybienia, liczba badanych pomieszczeń, N = 70
Liczba pleśni mierzona metodą hodowlaną	powierzchnie przegród budowlanych* (jtk/100 cm ²)	X: 7.8×10^7 Max.: 8.0×10^8 Min.: 2.0×10^4 S: 1.8×10^8	X: 3.3×10^3 Max.: 3.3×10^4 Min.: 1.0×10^2 S: 6.4×10^3
	powietrze wewnętrzne (jtk/m ³)	X: 3.1×10^3 Max.: 2.5×10^4 Min.: 1.4×10^2 S: 5.2×10^3	X: 2.1×10^2 Max.: 7.2×10^2 Min.: 4.0×10^1 S: 1.7×10^2
	powietrze atmosferyczne (jtk/m ³) liczba oznaczeń, N = 44	X: 5.4×10^2 Max.: 1.9×10^3 Min.: 8.0×10^1 S: 4.9×10^2	
Zawartość ergosterolu	powierzchnie przegród budowlanych* (μg/100 cm ²)	X: 12.2 Max.: 40.9 Min.: 1.2 S: 6.4	X: 3.6 Max.: 2.2 Min.: 1.0 S: 0.9
	powietrze wewnętrzne (μg/m ³)	X: 2.6 Max.: 6.4 Min.: 1.4 S: 1.3	X: 0.23 Max.: 0.3 Min.: 0.2 S: 0.06
	powietrze atmosferyczne (μg/m ³) liczba oznaczeń, N = 44	X: 1.05 Max.: 4.2 Min.: 0.25 S: 0.16	
Obecność stęchłego zapachu – liczba zgłoszeń		25/72 (34,7%)	2/70 (2,8%)

* powierzchnie przegród budowlanych: powierzchnie powłok malarskich, tapet, płyt gipsowo-kartonowych pokrytych powłoką malarską, drewna.

Min, Max – wartości minimalna, maksymalna, X – średnia, S – odchylenie standardowe.

Porównując liczbę pleśni w powietrzu wewnątrz budynków oraz atmosferycznym stwierdzono, iż w pomieszczeniach zagrzybionych poziom pleśni jest znacznie wyższy ($3,1 \times 10^3$ jtk/m³) niż w powietrzu atmosferycznym ($5,4 \times 10^2$ jtk/m³). Natomiast w pomieszczeniach kontrolnych obserwowano odwrotną tendencję lub porównywalny stopień zanieczyszczenia powietrza wewnątrz i na zewnątrz budynku. Wynik ten świadczy o aktywnym rozwoju grzybów strzępkowych w pomieszczeniach zagrzybionych.

Potwierdzenie tych wyników uzyskano stosując chemiczną metodę oznaczania ergosterolu. Średnia koncentracja ergosterolu na powierzchni przegród budowlanych w budynkach zagrzybionych wynosiła 12,2 µg/100 cm², a w pomieszczeniach kontrolnych 3,6 µg/100 cm². Jak wykazały wcześniejsze badania (Gutarowska i Żakowska, 2002) zawartość ergosterolu w materiale budowlanym powyżej 4 µg/100 cm² oznacza aktywny rozwój pleśni. Im proces zagrzybienia trwał dłużej, tym zawartość ergosterolu na przegrodzie budowlanej osiągała wyższe wartości, nawet 10-krotnie, tj. 40,9 µg/100 cm². Najwyższą zawartość ergosterolu w powietrzu odnotowano w pomieszczeniu zagrzybionym (6,4 µg/m³) i przekraczała ona 32-krotnie dopuszczalne normy oraz 6-krotnie poziom zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego (1,05 µg/m³).

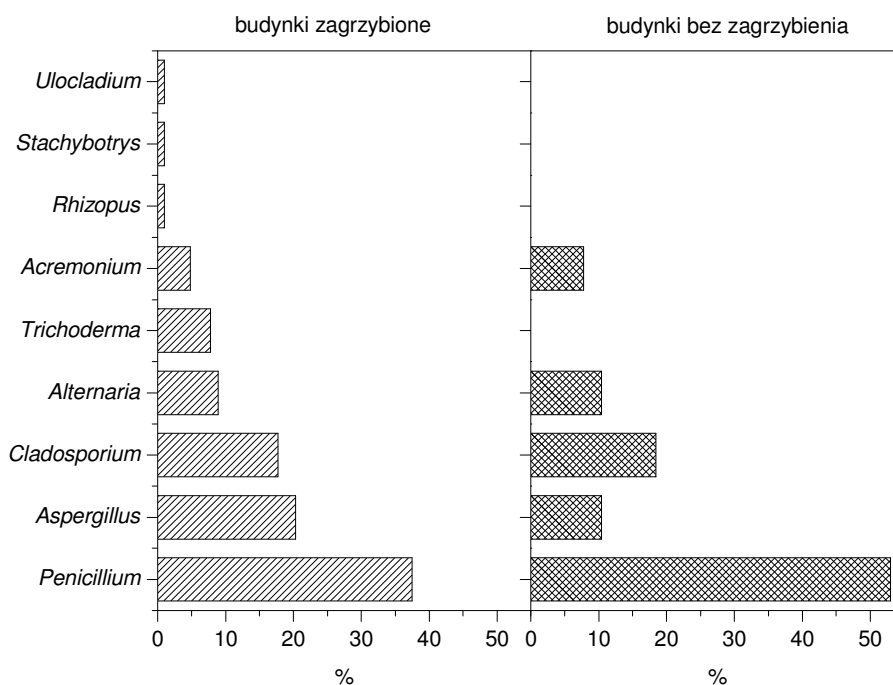
Do obliczenia dopuszczalnego poziomu ergosterolu w powietrzu wykorzystano dane literaturowe, wg których maksymalna zawartość ergosterolu wynosi około 40 pg/1 zarodnik (Pasanen i in., 1999). Przyjmując, że liczebność grzybów w powietrzu pomieszczeń mieszkalnych nie powinna przekraczać 5×10^2 jtk/m³ (Górny, 2004a), wyliczono dopuszczalną zawartość ergosterolu w powietrzu pomieszczeń mieszkalnych, co odpowiada 0,2 µg ergosterolu/m³ powietrza. Uwzględniając obliczoną wartość i porównując ją z uzyskanymi wynikami badania koncentracji ergosterolu w powietrzu wewnętrznym pomieszczeń zagrzybionych (2,6 µg/m³) i kontrolnych (0,23 µg/m³), wykazano dziesięciokrotnie wyższy poziom zanieczyszczenia pleśniami powietrza w budynkach zagrzybionych.

W budynkach zagrzybionych mieszkańcy dwanaście razy częściej sygnalizowali występowanie stęchłego pleśniowego zapachu (35%). W dwóch pomieszczeniach kontrolnych (1 budynek) mieszkańcy zauważyli także charakterystyczny zapach, co może wynikać z różnej wrażliwości sensorycznej ludzi lub okresowego pojawienia się pleśni w badanym budynku.

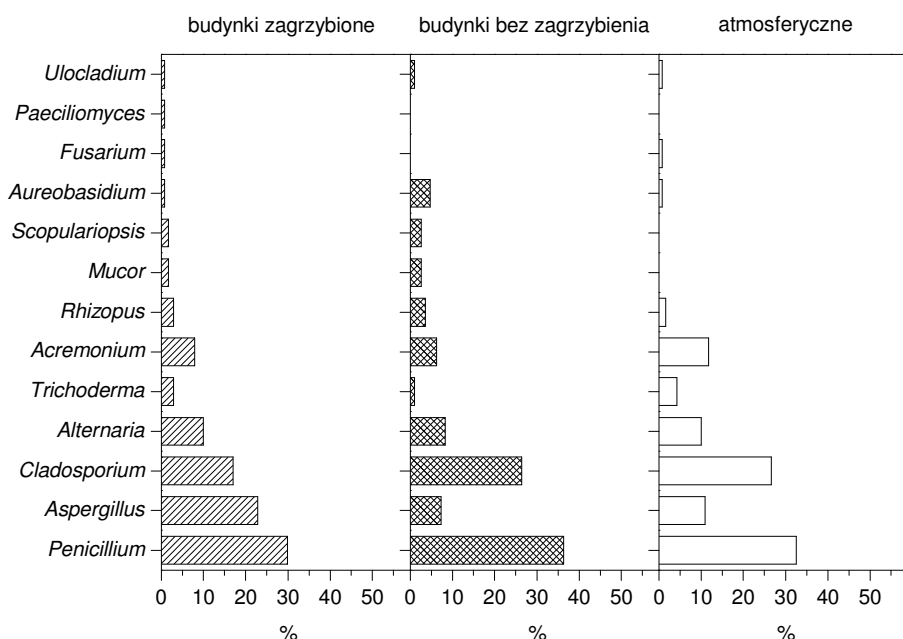
Grzyby strzępkowe wyizolowane z przegród budowlanych, powietrza wewnętrznego i atmosferycznego poddano identyfikacji (Rys. 1-2, Tabela 14) w celu wykazania różnic w składzie gatunkowym pleśni zasiedlających pomieszczenia zagrzybione i bez objawów zagrzybienia oraz wskazania, jakie gatunki występują w pomieszczeniach o wysokiej wilgotności względnej powietrza.

Budynki mieszkalne, zarówno zagrzybione, jak i bez objawów zagrzybienia zasiedlają grzyby strzępkowe należące do rodzajów: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Alternaria* (Rys. 1-2). Grzyby z rodzaju *Penicillium* występują z taką samą częstotliwością w powietrzu atmosferycznym i wewnętrznym, zarówno w budynkach zagrzybionych, jak i bez objawów zagrzybienia. Na przegrodach budowlanych pleśnie te występują częściej (o 16%) w pomieszczeniach bez objawów zagrzybienia. Nie stwierdzono istotnych różnic w występowaniu *Alternaria* i *Cladosporium* w obu rodzajach budynków i w powietrzu atmosferycznym. Jedyna różnica dotyczyła *Cladosporium*, które pojawiały się o 10% częściej w powietrzu wewnętrznym pomieszczeń niezagrzybionych.

Wykazano natomiast większą różnorodność pleśni w pomieszczeniach zagrzybionych, zarówno na przegrodach budowlanych (Rys. 1), jak i w powietrzu wewnętrznym (Rys. 2). Dwa rodzaje grzybów występowały wyłącznie w budynkach zagrzybionych: *Stachybotrys* na przegrodach budowlanych, *Paecilomyces* w powietrzu wewnętrznym. Obserwowano również częstsze (o 9-16%) występowanie grzybów z rodzaju *Aspergillus* w tych budynkach.



Rys. 1. Częstość występowania poszczególnych rodzajów grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych



Rys. 2. Częstość występowania poszczególnych rodzajów grzybów strzępkowych w powietrzu wewnętrznym oraz atmosferycznym

Porównując występowanie grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych oraz w powietrzu pomieszczeń stwierdzono, iż w większości przypadków te same rodzaje grzybów strzępkowych są obecne zarówno na przegrodach budowlanych, jak i w powietrzu wewnętrznym. Częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów strzępkowych w pomieszczeniach zagrzybionych i bez objawów zagrzybienia przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych, w powietrzu pomieszczeń oraz w powietrzu atmosferycznym

Gatunki grzybów strzępkowych	Częstość występowania poszczególnych gatunków grzybów strzępkowych; liczba izolacji w budynkach (%)				
	Zagrzybionych, N = 72		Bez zagrzybienia, N = 70		Powietrze atmosferyczne, N = 44
	Przegrody budowlane	Powietrze wewnętrzne	Przegrody budowlane	Powietrze wewnętrzne	
<i>Acremonium strictum</i>	7 (9,7%)	17 (23,6%)	7 (10,0%)	7 (10,0%)	11 (24,9%)
<i>Acremonium butyrii</i>	2 (2,8%)	2 (2,8%)	2 (2,8%)	5 (7,2%)	3 (6,8%)
<i>Alternaria alternata</i>	17 (23,6%)	24 (33,1%)	12 (17,2%)	16 (22,8%)	12 (27,2%)

<i>Aspergillus versicolor</i>	26 (35,9%)	25 (34,5%)	7 (10,0%)	5 (7,2%)	5 (11,4%)
<i>Aspergillus niger</i>	9 (12,5%)	19 (26,4%)	5 (7,2%)	7 (10,0%)	4 (9,1%)
<i>Aspergillus flavus</i>	2 (2,8%)	7 (9,7%)	–	2 (2,8%)	3 (6,8%)
<i>Aspergillus nidulans</i>	–	2 (2,8%)	–	–	–
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2 (2,8%)	2 (2,8%)	–	–	1 (2,3%)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	–	2 (2,8%)	–	9 (12,9%)	1 (2,3%)
<i>Cladosporium</i>		26 (35,9%)	12	16 (22,9%)	14 (31,8%)
<i>cladosporioides</i>		15 (20,7%)	(17,2%)	19 (27,2%)	14 (31,8%)
<i>Cladosporium herbarum</i>	19 (26,4%)	–	9 (12,9%)	5 (7,2%)	2 (4,5%)
<i>Cladosporium</i>	15 (20,7%)	–	–	7 (10,0%)	1 (2,3%)
<i>sphaerospermum</i>	–	–	2 (2,8%)	5 (7,2%)	1 (2,3%)
<i>Cladosporium</i>	–		–		
<i>macrocarpum</i>					
<i>Cladosporium resinae</i>					
<i>Fusarium sp.</i>	–	2 (2,8%)	–	–	1 (2,3%)
<i>Mucor globosus</i>	–	4 (5,5%)	–	5 (7,2%)	–
<i>Paecilomyces variotii</i>	–	2 (2,8%)	–	–	–
<i>Penicillium albidum</i>	–	–	–	2 (2,8%)	1 (2,3%)
<i>Penicillium</i>	7 (9,7%)	9 (12,5%)	2 (2,8%)	2 (2,8%)	1 (2,3%)
<i>aurantiogriseum</i>	7 (9, 7%)	4 (5,5%)	2 (2,8%)	2 (2,8%)	1 (2,3%)
<i>Penicillium</i>	33 (45,5%)	31 (42,8%)	47 (67,2%)	54 (77,2%)	26 (59,0%)
<i>brevicompactum</i>	–	2 (2,8%)	–	2 (2,8%)	1 (2,3%)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	–	–	–	2 (2,8%)	1 (2,3%)
<i>Penicillium citrinum</i>	–	2 (2,8%)	2 (2,8%)	2 (2,8%)	1 (2,3%)
<i>Penicillium cyclopium</i>	2 (2,8%)	2 (2,8%)	–	–	4 (9,1%)
<i>Penicillium digitatum</i>	19 (26,4%)	2 (2,8%)	–	–	–
<i>Penicillium diversum</i>	2 (2,8%)	11 (15,2%)	2 (2,8%)	2 (2,8%)	3 (6,8%)
<i>Penicillium echinulatum</i>	2 (2,8%)	4 (5,5%)	2 (2,8%)	–	1 (2,3%)
<i>Penicillium expansum</i>	–	2 (2,8%)	–	–	–
<i>Penicillium granulatum</i>		–	2 (2,8%)	2 (2,8%)	–
<i>Penicillium italicum</i>		2 (2,8%)	–	–	–
<i>Penicillium spinulosum</i>					
<i>Penicillium terrestre</i>					
<i>Rhizopus nigricans</i>	2 (2,8%)	7 (9,7%)	–	7 (10,0%)	2 (4,5%)
<i>Scopulariopsis</i>	–	4 (5,5%)	–	5 (7, 2%)	–
<i>brevicaulis</i>					
<i>Stachybotrys chartarum</i>	2 (2,8%)	–	–	–	–
<i>Trichoderma viride</i>	15 (20,7%)	7 (9,7%)	–	2 (2,8%)	5
<i>Ulocladium chartarum</i>	2 (2,8%)	2 (2,8%)	–	2 (2,8%)	1 (2,3%)

– nieobecny.

Stwierdzono, iż zarówno w budynkach zagrzybionych, jak i bez objawów zagrzybienia występują grzyby strzępkowe zaliczane do gatunków: *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* i *Acremonium strictum*.

Znacznie częściej w porównaniu z pomieszczeniami kontrolnymi (z częstotliwością od 3% do 27%) na przegrodach budowlanych oraz w powietrzu obiektów zagrzybionych obecne były grzyby z rodzaju *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*). Szczególnie istotne różnice zoobserwowano w przypadku gatunku *Aspergillus versicolor*. Również *Trichoderma viride* częściej występował w budynkach zagrzybionych (9,7-20,7%), natomiast na przegrodach budowlanych w pomieszczeniach kontrolnych nie stwierdzono jego obecności, a w powietrzu był obecny tylko w 2,8% pomieszczeń; występował również rzadko w powietrzu atmosferycznym (4,5%). Obecność gatunków *Stachybotrys chartarum*, *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium terrestre* zanotowano tylko w budynkach zagrzybionych.

Biorąc pod uwagę wilgotność powietrza w mieszkaniach zagrzybionych, wyodrębniono grupy grzybów, których rozwój występował przy określonych wartościach tego parametru (Tabela 15).

Tabela 15. Gatunki grzybów strzępkowych wyizolowane z powietrza o różnej wilgotności względnej

Wilgotność względna powietrza (%)		
30-40	40-50	80-90
<i>Penicillium albidum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Penicillium spinulosum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>macrocarpum</i>
	<i>Penicillium echinulatum</i>	<i>Mucor globosus</i>
		<i>Penicillium granulatum</i>
		<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
		<i>Ulocladium chartarum</i>

Gatunki pleśni należące do rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* notowano głównie w powietrzu o wilgotności względnej 30-50%, jedynie *A. versicolor* i *A. nidulans* oraz *P. granulatum* występowały przy wilgotności względnej 80-90%. W tych warunkach rejestrowano również rozwój takich gatunków, jak *Cladosporium macrocarpum*, *Mucor globosus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Ulocladium chartarum*.

Przeprowadzono także pomiar zawartości ergosterolu oraz wyizolowano i zidentyfikowano pleśnie zasiedlające różne materiały budowlane, wykończeniowe

i termomodernizacyjne. Podstawą tych badań było założenie, iż poszczególne materiały budowlane mogą stymulować wzrost określonych gatunków i rodzajów pleśni i w konsekwencji wydzielanie do otoczenia toksycznych metabolitów, jak również alergenów.

Z pomieszczeń w budynkach zagrzybionych, w których panowały różne warunki temperatury i wilgotności, pobrano 103 próbki wymazów z materiałów, w których oznaczano zawartość ergosterolu oraz zidentyfikowano grzyby strzępkowe (Tabela 16).

Tabela 16. Materiały budowlane, wykończeniowe i termomodernizacyjne pochodzące z budynków mieszkalnych i zasiedlające je grzyby strzępkowe

Materiał N – liczba prób	Powietrze		Zawartość ergosterolu ($\mu\text{g}/100\text{ cm}^2$), zakres Min-Max	Gatunki grzybów strzępkowych
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Wilgotność względna (%)		
Drewno nielakierowane, N = 2	20-22	70-80	9,1-27,4	<i>A. strictum</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>T. viride</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>C. cladosporioides</i>
Płyta gipsowo- kartonowa, N = 3	20-22	60-80	6,0-40,9	<i>A. butyrii</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>C. cladosporioides</i>
Płyta gipsowo- kartonowa z powłoką emulsyjną, N = 15	18-22	60-80	5,9-29,6	<i>A. alternata</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>S. chartarum</i> , <i>T. viride</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i>
Pianka poliuretanowa, N = 4	20-22	50-80	1,2-5,4	<i>A. alternata</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. diversum</i> , <i>U. chartarum</i> , <i>C. cladosporioides</i>
Gips, N = 1	20	70	6,9	<i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>

Tabela 16 (cd.)

Gips z powłoką emulsyjną, N = 5	18-22	50-70	3,5-27,4	<i>A. alternata</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>T. viride</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i>
Styropian, N = 4	18-22	70-80	6,6-17,5	<i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> <i>C. herbarum</i> , <i>C. cladosporioides</i>
Zaprawa, N = 2	14-18	70-90	9,5-11,9	<i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>
Zaprawa z powłoką emulsyjną, N = 18	20-22	70-80	5,5-7,6	<i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i> <i>P. expansum</i> , <i>R. nigricans</i>
Tapeta, N = 23	20-22	50-80	4,2-15,4	<i>A. strictum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. haerbarum</i>
Cement, N = 1	18	70	1,2	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. expansum</i>
Wełna mineralna, N = 4	20-22	70-80	8,5-9,5	<i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. macrocarpum</i>
Skóra tapicerska, N = 2	20-22	70-80	7,8-30,5	<i>A. alternata</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. granulatum</i>
Wykładzina dywanowa, N = 10	18-22	60-80	4,9-12,3	<i>A. strictum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. chrysogenum</i>
Skaj, N = 3	20-22	70-80	7,9-12,6	<i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. expansum</i> , <i>C. cladosporioides</i>
Wykładzina PCV, N = 1	20	70	1,9	<i>A. versicolor</i> , <i>P. aurantigriseum</i>
Beton komórkowy, N = 5	18-22	50-80	8,4-9,7	<i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>C. cladosporioides</i>

Najczęściej obecność pleśni obserwowano na tapetach (N = 23), zaprawach tynkarskich z powłoką emulsyjną (N = 18), płytach gipsowo-kartonowych z powłoką emulsyjną (N = 15) oraz wykładzinach dywanowych (N = 10). Materiały te pochodziły z pomieszczeń, w których panowała różna wilgotność powietrza (od 50% do 80%) i temperatura (od 18 do 22°C). Koncentracja ergosterolu w próbkach zależała od rodzaju materiału budowlanego i kształtowała się w granicach 1,2-40,9 µg/100 cm². Najniższą koncentrację ergosterolu (1,2-5,4 µg/100 cm²) stwierdzono na piance poliuretanowej, wykładzinach PCV i cemencie. Na tych materiałach występowały głównie grzyby z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*. Na piance poliuretanowej stwierdzono również obecność *Cladosporium*, *Alternaria* i *Ulocladium*. Niska zawartość ergosterolu świadczyła o braku aktywnego rozwoju grzybni, co mogło wynikać z nieodpowiednich warunków do wzrostu grzybów: braku dostępnego substratu lub niskiej chłonności wody (materiały polimerowe, nieorganiczne – cement). Największą zawartość ergosterolu wykryto na płytach gipsowo-kartonowych bez powłoki emulsyjnej (6-40,9 µg/100 cm²) oraz płytach gipsowo-kartonowych z powłoką emulsyjną (5,9-29,6 µg/100 cm²), na skórze tapicerskiej (7,8-30,5 µg/100 cm²), drewnie (9,1-27,4 µg/100 cm²) oraz gipsie z powłoką emulsyjną (3,5-27,4 µg/100 cm²). Podwyższona zawartość ergosterolu na tych materiałach wskazywała na korzystne warunki do aktywnego rozwoju pleśni. Wysoką zawartość ergosterolu (4,2-17,5 µg/100 cm²) oraz zasiedlanie przez liczne gatunki pleśni obserwowano również na styropianie, tapecie, wykładzinie dywanowej, wełnie mineralnej i skaju, co świadczy, iż grzyby są zdolne do rozwoju nie tylko na materiałach pochodzenia organicznego (tapeta), ale również materiałach polimerowych (styropian, wełna mineralna, skaj) oraz mieszanych (wykładzina dywanowa). Zaskakująco aktywny wzrost grzybów obserwowano na materiałach nieorganicznych, takich jak zaprawa tynkarska (9,5-11,9 µg/100 cm²), beton komórkowy i gips (3,5-27,4 µg/100 cm²) przechowywanych w warunkach wysokiej wilgotności względnej powietrza (50-90%).

Występowanie poszczególnych gatunków grzybów strzępkowych nie zależało od rodzaju materiału budowlanego. Wykazano również, iż powłoka emulsyjna na płycie gipsowo-kartonowej, gipsie oraz zaprawie nie zabezpieczała przed rozwojem grzybów strzępkowych.

Podsumowanie

Mikologiczne badania środowiskowe wykazały, iż w pomieszczeniach zagrzybionych występował 10-krotnie wyższy poziom koncentracji grzybów strzępkowych w powietrzu; oznaczano także 10000 razy więcej grzybów na powierzchni przegród budowlanych w porównaniu z pomieszczeniami bez objawów zagrzybienia. Stwierdzono znacznie częstsze występowanie *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus*

niger, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* w powietrzu pomieszczeń zagrzybionych niż kontrolnych. Wykazano, iż gatunki *Stachybotrys chartarum*, *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium terrestre* były obecne tylko w budynkach zagrzybionych. Wskazano gatunki pleśni występujące jedynie w pomieszczeniach zagrzybionych o wysokiej wilgotności względnej powietrza (80-90%), które mogą być wskaźnikami zawilgocenia materiałów budowlanych. Wśród tych gatunków występowały grzyby toksynotwórcze i chorobotwórcze: *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium macrocarpum*, *Ulocladium chartarum*, *Scopulariopsis brevicaulis*.

Wykazano, iż grzyby strzępkowe są zdolne do wzrostu w mieszkaniach na większości materiałów stosowanych w budownictwie, zarówno konstrukcyjnych, wykończeniowych, jak również termoizolacyjnych. Najczęstsze i największe zagrzybienie obserwowano na powierzchni materiałów pochodzenia organicznego lub mieszanych (drewno, skóra, płyty kartonowo-gipsowe, tapeta). Aktywny wzrost pleśni obserwowano również na materiałach nieorganicznych (zaprawa, beton, gips) oraz materiałach polimerowych (styropian, wełna mineralna, skaj).

Postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy grzyby porażające przegrody budowlane w budynkach mieszkalnych są toksyczne i szkodliwe dla zdrowia mieszkańców?

4.1.3. Mikotoksyny na przegrodach budowlanych oraz ich cytotoksyczność i genotoksyczność

Celem tych badań było wykazanie, czy grzyby strzępkowe rozwijające się na przegrodach budowlanych wytwarzają mikotoksyny o właściwościach cytotoksycznych i genotoksycznych. W badanych pomieszczeniach pobrano próbki wymazów z przegród budowlanych, w których oznaczano obecność mikotoksyn metodą TLC (metodyka p. 3.9.1), cytotoksyczność ogólną metodą MTT (p. 3.10) i genotoksyczność metodą MLA (p. 3.11). Równolegle oznaczano zdolność tworzenia mikotoksyn przez wyizolowane z pomieszczeń grzyby podczas ich wzrostu na pożywce YES. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 17.

Uzyskane wyniki wskazują na nieobecność mikotoksyn oraz brak efektów cytotoksycznego i genotoksycznego próbek pobranych z przegród budowlanych pomieszczeń zagrzybionych. Jedynie w przypadku 3% próbek wykazano niski efekt cytotoksyczny, co mogło wynikać z oddziaływania samego materiału budowlanego. Wyniki badania zdolności wytwarzania mikotoksyn na podłożu YES przez szczepy pleśni wyizolowane z budynków wykazały, iż pleśnie produkują mikotoksyny takie, jak sterigmatocystyna, ochratoksyna A, aflatoksyna B₁ oraz inne mikotoksyny nie zidentyfikowane metodą TLC (Tabela 17).

Tabela 17. Mikotoksyny w wymazach z przegród budowlanych oraz ich cytotoxycznosc i genotoksycznosc

Oznaczenia (metoda)	Czestość występowania w pomieszczeniach zagrzybionych (%), liczba zbadanych próbek, N = 34
Mikotoksyny na przegrodach budowlanych (TLC)	0%
Mikotoksyny w hodowlach na podłożu YES pleśni wyzolowanych z przegród budowlanych:	
Sterigmatocystyna	8,6%
Ochratoksyna A	5,7%
Aflatoksyna B ₁	2,8%
inne mikotoksyny*	71,4%
Cytotoksycznosc ogólna (MTT)	
–	97%
+	3%
++	0%
+++	0%
Genotoksycznosc (MLA)	
–	100%

– brak efektu cytotoksycznego, genotoksycznego, + cytotoksycznosc niska, ++ cytotoksyczna
średnia, +++ cytotoksycznosc wysoka, porównywalna z dodatnią próbą kontrolną (standardy
mikotoksyn)

* mikotoksyny niezidentyfikowane (obecne świecące plamy w świetle UV przy $\lambda = 360$ nm)

Podsumowanie

Materiały przegród budowlanych porażonych przez grzyby strzępkowe nie wykazywały obecności mikotoksyn ani oddziaływania cyto- i genotoksycznego. Natomiast wyizolowane szczepy grzybów zachowały aktywność toksynotwórczą, która ujawniła się w warunkach laboratoryjnych na podłożu bogatym w związki organiczne (YES). Badania mikotoksyn w środowisku budynków i na pożywce YES prowadzone skринingową metodą TLC, wykazały obecność mikotoksyn w pożywce mikrobiologicznej, natomiast brak tych związków na przegrodach budowlanych. Mogło to wynikać z niewielkiej ilości grzybni na przegrodach budowlanych i niskiego stężenia mikotoksyn, poniżej progu wykrywalności metodą TLC (1-20 ng, w zależności od mikotoksyny). Brak mikotoksyn na przegrodach budowlanych w warunkach mieszkalnych mógł być spowodowany nieodpowiednimi dla pleśni warunkami do syntezy tych związków. Podjęto więc badania zmierzające do wyjaśnienia, jakie czynniki mogą wpływać na tworzenie mikotoksyn oraz cyto- i genotoksycznosc w ustalonych warunkach laboratoryjnych (rozdział 4.2.6). Jednocześnie, w celu wskazania, czy istnieje zależność między obecnością mikotoksyn w budynkach a ewentualnymi objawami chorobowymi, przeprowadzono ocenę stanu zdrowia mieszkańców.

4.1.4. Stan zdrowia mieszkańców

Mieszkańców budynków zagrzybionych i kontrolnych poddano badaniom lekarskim w celu ustalenia występowania objawów alergii oraz Zespołu Chorego Budynku (SBS) (metodyka p. 3.12). Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 18.

Tabela 18. Częstość występowania objawów alergii i SBS u mieszkańców budynków

Objawy alergii i SBS *		Liczba i częstość występowania (%)	
		Mieszkańcy pomieszczeń zagrzybionych, N = 40	Mieszkańcy pomieszczeń bez zagrzybienia, N = 20
Objawy alergii	Kaszel	19 (47,5%)	5 (23,8%)
	Duszność	13 (32,5%)	4 (19,04%)
	Katar	23 (57,5%)	11 (52,3%)
	Objawy ze strony spojówek	26 (65%)	7 (33,3%)
	Obrzęki	11 (27,5%)	0
	Swędzące wykwity skórne	21 (52,5%)	9 (42,9%)
Poziom przeciwciał w surowicy IgE > 100 KU/l**		13 (39,4%)	3 (17,6%)
Pozytywne testy skórne (SPT) oraz z surowicy krwi (Elisa) potwierdzające alergię na grzyby strzępkowe		4 (10%)	0
Wybrane objawy niespecyficzne, zaliczane do SBS	Bóle głowy	18 (45%)	5 (23,8%)
	Zaburzenia snu	17 (42,5%)	5 (23,8%)
	Zaburzenia koncentracji	4 (10%)	4 (10%)
	Ogólne osłabienie	13 (32,5%)	3 (14,3%)
	Nadmierne pocenie	15 (37,5%)	4 (19%)
	Uczucie zmęczenia	18 (45%)	6 (30%)
	Bóle w okolicy serca	9 (22,5%)	2 (9,5%)
	Rozdrażnienie	15 (37,5%)	4 (19%)
	Podrażnienie błon śluzowych nosa, oczu, gardła	17 (42,5%)	6 (30%)
	Podrażnienie skóry	9 (22%)	1 (5%)
	Bóle gardła	9 (22,5%)	0

* wyniki badań lekarzy z Zakładu Chorób Zawodowych i Toksykologii IMP w Łodzi prowadzonych w ramach wspólnego projektu (Grant UM Łodzi 2003/2004, kierownik dr B.Gutarowska)

SBS – Sick Building Syndrome – Zespół Chorego Budynku

** KU/l - międzynarodowa jednostka stężenia przeciwciał IgE

Porównując występowanie objawów alergii u mieszkańców, stwierdzono od 5% do 25% większą częstość ich występowania u osób zamieszkujących budynki zagrzybione. Szczególnie dotyczyło to duszności, kaszlu, objawów ze strony spojówek, obrzęków, wykwitów skórnych. U mieszkańców zagrzybionych budynków obserwowano znacznie częściej (kilkanaście do dwudziestu procent) objawy niespecyficzne zaliczane do SBS. Dotyczyło to głównie: bólu głowy, zaburzenia snu, ogólnego osłabienia, rozdrażnienia, podrażnienia skóry, bólu gardła.

U około 40% mieszkańców zagrzybionych budynków notowano podwyższony poziom IgE w surowicy krwi; dla porównania – w budynkach kontrolnych podwyższony poziom IgE stwierdzono u 18% mieszkańców. U 10% osób zamieszkujących pomieszczenia zagrzybione (4/40 badanych) wykazano uczulenie na grzyby strzępkowe na podstawie wyników testów skórnych. Osoby te poddano szczegółowym badaniom w kierunku alergii na grzyby obecne w ich pomieszczeniach mieszkalnych (metodyka p. 3.13). Wyniki tych badań oraz stopień zanieczyszczenia grzybami użytkowanych przez nich pomieszczeń przedstawiono w tabeli 19.

U badanych mieszkańców wystąpiły objawy alergiczne, takie jak kaszel, katar, wykwity skórne, objawy ze strony układu oddechowego, również astma (mieszkaniec nr 1). W surowicy krwi mieszkańców stwierdzono wysoki poziom IgE (mieszkaniec nr 3: 10-krotnie wyższy niż graniczny, 100 KU/L, wskazujący na alergię; wyjątek mieszkaniec nr 4, z niskim poziomem IgE). Alergię na grzyby strzępkowe potwierdzono w testach skórnych. Wykazano również obecność w surowicy krwi swoistych przeciwciał asIgE przeciw grzybom strzępkowym. Analiza metodą immunoblottingu potwierdziła alergię (mieszkaniec nr 1 i 3) na większość lub wszystkie pleśnie obecne w pomieszczeniach. Dzięki tej analizie wykryto białka alergenne, na które byli uczuleni mieszkańcy. Wszyscy byli uczuleni na antygeny *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* i *Cladosporium cladosporioides*. Alergeny *Penicillium chrysogenum*, które spowodowały reakcje alergiczne; to białka o masach cząsteczkowych: 21 kDa, 24 kDa, 27 kDa, 32 kDa (białko alergenne sklasyfikowane jako Pen ch 18), 33 kDa (Pen c 13), 34 kDa (Pen ch 13), 40 kDa (Pen c 32), 43 kDa, 46 kDa (Pen c 22w), 68 kDa (Pen ch 20), 85 kDa, 89 kDa. Wśród białek alergennych *A.alternata* o masach od 22 kDa do 64 kDa są białka sklasyfikowane jako alergeny Alt a 1, Alt a 7, Alt a 13, Alt a 10; pozostałe białka dotad nie były sklasyfikowane, podobnie jak alergeny *P.expansum* o masach 16-93 kDa (z wyjątkiem sklasyfikowanych alergenów Pen c 19, Pen c 22w, Pen c 32, Pen c 13, Pen ch 33). Wśród białek *Cladosporium cladosporioides* o masach od 11 do 53 kDa, które reagowały z badanymi surowicami, występowały cztery sklasyfikowane alergeny: Cla h 4, Cla h 5, Cla h 6 i Cla h 9.

Tabela 19. Poziom zagrzybienia pomieszczeń oraz występowanie alergii na grzyby strzępkowe u mieszkańców zagrzybionych budynków

Rodzaj oznaczenia/ metoda		Wynik oznaczenia
<i>Mieszkaniec nr 1 (płeć – żeńska, wiek – 10 lat)</i>		
Zagrzybienie pomieszczenia	Liczba grzybów (wynik średni) – w powietrzu wewnętrznym (jtk/m ³) – na przegrodzie budowlanej (jtk/100 cm ²)	9,5×10 ² 3,3×10 ⁴
	Gatunki grzybów wyizolowane z powietrza (p) i przegrody budowlanej (b)	<i>Penicillium chrysogenum</i> (p), <i>Alternaria alternata</i> (p, b), <i>Aspergillus flavus</i> (p, b), <i>Aspergillus niger</i> (p, b), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (p, b), <i>Penicillium expansum</i> (p, b),
Alergia	Objawy alergii w wywiadzie lekarskim	astma, objawy ze strony układu oddechowego, skórne
	Poziom przeciwciał w surowicy krwi całkowite IgE (KU/l)* ¹	139,0
	Testy skórne SPT ¹ reakcja skórna na mix alergenów grzybów strzępkowych – zestaw I, II** oraz poszczególnych gatunków testowych	zestaw I – reakcja pozytywna zestaw II – reakcja negatywna gatunki: <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuis</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus mix.</i> , <i>Penicillium mix.</i> , <i>Cladosporium mix</i> – <i>reakcja pozytywna</i>
	Testy Elisa z surowicy krwi ¹ wykrywanie specyficznych przeciwciał asIgE przeciw alergenom grzybów strzępkowych, w reakcji z mix2*** oraz poszczególnych gatunków testowych	mix2 – reakcja pozytywna gatunki: <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium notatum</i> – <i>reakcja pozytywna</i>
	Testy immunoblotting antygenów (gatunków grzybów wyizolowanych z budynku mieszkalnego) z surowicą krwi, M _{cz} białek reagujących z surowicą krwi (kDa) (oznaczenie sklasyfikowanych antygenów)	<i>Aspergillus flavus</i> : 71 kDa; <i>Aspergillus niger</i> : 34 kDa (Asp n 18), 105 kDa (Asp n 14); <i>Penicillium chrysogenum</i> : 27 kDa, 34 kDa (Pen ch13), 43 kDa, 89 kDa; <i>Penicillium expansum</i> : 70 kDa (Pen c 19), 88 kDa; <i>Alternaria alternata</i> : 28 kDa (Alt a 1), 53 kDa (Alt a 10), 64 kDa; <i>Cladosporium cladosporioides</i> : 36 kDa (Cla c 9), 53 kDa.
<i>Mieszkaniec nr 2 (płeć - męska, wiek – 18 lat)</i>		
Zagrzybienie pomieszczenia	Liczba grzybów (wynik średni) – w powietrzu wewnętrznym (jtk/m ³) – na przegrodzie budowlanej (jtk/100 cm ²)	2,2×10 ² 1,9×10 ⁵

	Gatunki grzybów wyizolowane z powietrza (p) i przegrody budowlanej (b)	<i>Acremonium strictum</i> (p), <i>Alternaria alternata</i> (p, b), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (p), <i>Cladosporium herbarum</i> (p, b), <i>Penicillium chrysogenum</i> (p, b), <i>Aspergillus niger</i> (p)
Alergia	Objawy alergii w wywiadzie lekarskim	nieżyt nosa, kaszel, objawy ze strony układu oddechowego
	Poziom przeciwciał w surowicy krwi całkowite IgE (KU/l)* ¹	91,9
	Testy skórne SPT ¹ reakcja skórna na mix alergenów grzybów strzępkowych – zestaw I, II** oraz poszczególnych gatunków testowych	zestaw I – reakcja pozytywna zestaw II – reakcja negatywna gatunki: <i>Alternaria alternata</i> – reakcja pozytywna
	Testy Elisa z surowicy krwi ¹ wykrywanie specyficznych przeciwciał asIgE przeciw alergenom grzybów strzępkowych, w reakcji z mix2*** oraz poszczególnych gatunków testowych	gatunki: reakcja negatywna
	Testy immunoblotting antygenów (gatunków grzybów wyizolowanych z budynku mieszkalnego) z surowicą krwi, M _{cz} białek reagujących z surowicą krwi (kDa) (oznaczenie sklasyfikowanych antygenów)	<i>Penicillium chrysogenum</i> : 21 kDa, 27 kDa, 32 kDa (Pen ch 18), 33 kDa (Pen c 13), 34 kDa (Pen ch13), 40 kDa (Pen c 32); <i>Penicillium expansum</i> : 70 kDa (Pen c 19), 88 kDa; <i>Alternaria alternata</i> : 28 kDa (Alt a 1), 53 kDa (Alt a 10); <i>Aspergillus niger</i> : 105 kDa (Asp n 14); <i>Cladosporium cladosporioides</i> : 11 kDa (Cla h 4), 22 kDa (Cla h 5), 36 kDa (Cla c 9), 46 kDa (Cla h 6)
<i>Mieszkaniec nr 3 (płeć – żeńska, wiek – 27 lat)</i>		
Zagrzybenie pomieszczenia	Liczba grzybów (wynik średni) – w powietrzu wewnętrznym (jtk/m ³) – na przegrodzie budowlanej (jtk/100 cm ²)	1,3×10 ³ 7,6×10 ⁶
	Gatunki grzybów wyizolowane z powietrza (p) i przegrody budowlanej (b)	<i>Alternaria alternata</i> (p), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (p), <i>Penicillium chrysogenum</i> (p, b), <i>Penicillium expansum</i> (p, b),
Alergia	Objawy alergii w wywiadzie lekarskim	astma, kaszel, katar, objawy ze strony układu oddechowego, wykwity skórne
	Poziom przeciwciał w surowicy krwi całkowite IgE (KU/l)* ¹	1328,0

	Testy skórne SPT ¹ reakcja skórna na mix alergenów grzybów strzępkowych – zestaw I, II** oraz poszczególnych gatunków testowych	zestaw I – reakcja pozytywna zestaw II – reakcja negatywna gatunki: <i>Alternaria alternata</i> – reakcja pozytywna
	Testy Elisa z surowicy krwi ¹ wykrywanie specyficznych przeciwciał asIgE przeciw alergenom grzybów strzępkowych, w reakcji z mix2*** oraz poszczególnych gatunków testowych	mix2 – reakcja pozytywna gatunki: <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium</i> <i>notatum</i> – reakcja pozytywna
	Testy immunoblotting antygenów (gatunków grzybów wyizolowanych z budynku mieszkalnego) z surowicą krwi, M _{cz} białek reagujących z surowicą krwi (kDa) (oznaczenie sklasyfikowanych antygenów)	<i>Penicillium chrysogenum</i> : 24 kDa, 85 kDa; <i>Penicillium expansum</i> : 16 kDa, 33 kDa, 40 kDa, 46 kDa, 53 kDa, 64 kDa, 79 kDa, 88 kDa; <i>Alternaria alternata</i> : 28 kDa (Alt a 1), 22 kDa (Alt a 7), 26 kDa (Alt a 13), 28 kDa, 53 kDa (Alt a 10), 64 kDa; <i>Cladosporium cladosporioides</i> : 46 kDa (Cla h 6), 48 kDa
<i>Mieszkaniec nr 4 (płeć – męska, wiek – 31 lat)</i>		
Zagrzybenie pomieszczenia	Liczba grzybów (wynik średni) – w powietrzu wewnętrznym (jtk/m ³) – na przegrodzie budowlanej (jtk/100 cm ²)	7,3×10 ² 1,4×10 ⁵
	Gatunki grzybów wyizolowane z powietrza (p) i przegrody budowlanej (b)	<i>Acremonium strictum</i> (p), <i>Alternaria alternata</i> (p, b), <i>Aspergillus flavus</i> (p, b), <i>Aspergillus niger</i> (p, b), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (p), <i>Penicillium chrysogenum</i> (p, b), <i>Penicillium expansum</i> (p, b),
Alergia	Objawy alergii w wywiadzie lekarskim	kaszel, katar, objawy ze strony układu oddechowego, wykwity skórne
	Poziom przeciwciał w surowicy krwi całkowite IgE (KU/l)* ¹	16,4
	Testy skórne SPT ¹ reakcja skórna na mix alergenów grzybów strzępkowych – zestaw I, II** oraz poszczególnych gatunków testowych	zestaw I – reakcja pozytywna zestaw II – reakcja negatywna gatunki: <i>Alternaria alternata</i> – reakcja pozytywna

Testy Elisa z surowicy krwi ¹ wykrywanie specyficznych przeciwciał asIgE przeciw alergenom grzybów strzępkowych, w reakcji z mix2*** oraz poszczególnych gatunków testowych	gatunki: reakcja negatywna
Testy immunoblotting antygenów (gatunków grzybów wyizolowanych z budynku mieszkalnego) z surowicą krwi, M _{cz} białek reagujących z surowicą krwi (kDa) (oznaczenie sklasyfikowanych antygenów)	<i>Penicillium expansum</i> : 70 kDa (Pen c 19), 88 kDa, 93 kDa; <i>Penicillium chrysogenum</i> : 46 kDa (Pen c 22w), 68 kDa (Pen ch 20); <i>Alternaria alternata</i> : 28 kDa (Alt a 1), 53 kDa (Alt a 10); <i>Aspergillus flavus</i> : 34 kDa (Asp fl 13); <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> : 48 kDa

¹ wyniki badań lekarzy z Zakładu Chorób Zawodowych i Toksykologii IMP w Łodzi prowadzonych w ramach wspólnego projektu (Grant UM Łodzi 2003/2004, kierownik dr B. Gutarowska)

* za podwyższony uznaje się poziom całkowity IgE powyżej stężenia 100 KU/l

*** zestaw I: mix alergenów *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*

zestaw II: mix alergenów *Aspergillus fumigatus*, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*

alergeny poszczególnych gatunków: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*, *Pullularia pullulans*, *Rhizopus nigricans*, *Phoma betae*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus mix*, *Cladosporium mix*, *Penicillium mix*

*** zestaw pleśni w mix2: *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*

Mieszkaniec nr 1 dodatkowo był uczulony na białka pleśni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger*, mieszkaniec nr 2 – na białka *A.niger*, a mieszkaniec nr 3 – na białka *A.flavus*. Większość z tych białek nie jest sklasyfikowana przez IUISA (22 na 39 białek, które reagowały z badanymi surowicami). Najczęstszą reakcję alergiczną obserwowano dla białka *Penicillium expansum* o masach cząsteczkowych 88 kDa i 70 kDa (Pen c 19) oraz *Alternaria alternata* o masach 30 kDa (Alt a 1) i 53 kDa (Alt a 10).

W przeprowadzonych badaniach dodatkowo wykazano przewagę testu immunoblotting nad pozostałymi testami wykorzystywanymi w diagnozowaniu alergii na pleśnie, gdyż test ten daje najpełniejszą informację o narażeniu na alergeny obecne w budynkach. Metoda immunoblotting udowodniła występowanie alergii na grzyby obecne w zamieszkiwanych pomieszczeniach, czego nie udało się stwierdzić wykorzystując zestawy diagnostyczne do testów skórnych oraz wykrywając specyficzne przeciwciała w surowicy krwi metodą Elisa.

Podsumowanie

W badaniach potwierdzono szkodliwość zdrowotną pleśni występujących w pomieszczeniach zagrzybionych, jednak wyniki wskazywały na istnienie innych niż mikotoksyny czynników, które wpływają na pogorszenie stanu zdrowia użytkowników tych mieszkań, a którymi były białka alergenne. Wykazano przy tym, częstsze o około 20%, występowanie objawów alergii i SBS u mieszkańców zagrzybionych budynków, niż to miało miejsce w mieszkaniach kontrolnych. U 10% mieszkańców zagrzybionych budynków wykryto alergię na grzyby strzępkowe tam obecne, potwierdzoną w testach skórnych (SPT), Elisa i immunoblotting. Najczęściej wykrywano alergię na antygeny pleśni *Penicillium chrysogenum*, *P.expansum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* oraz *Aspergillus niger* i *A. flavus*. Wykryto antygeny białkowe grzybów strzępkowych, które reagowały z surowicami krwi mieszkańców. Większość wykrytych białek nie była dotąd opisywana i klasyfikowana przez IUISA. Szczególnie istotne są białka alergenne *Penicillium expansum* o masach cząsteczkowych 71 oraz 88 kDa, które reagowały z przeciwciałami obecnymi w surowicach wszystkich badanych mieszkańców.

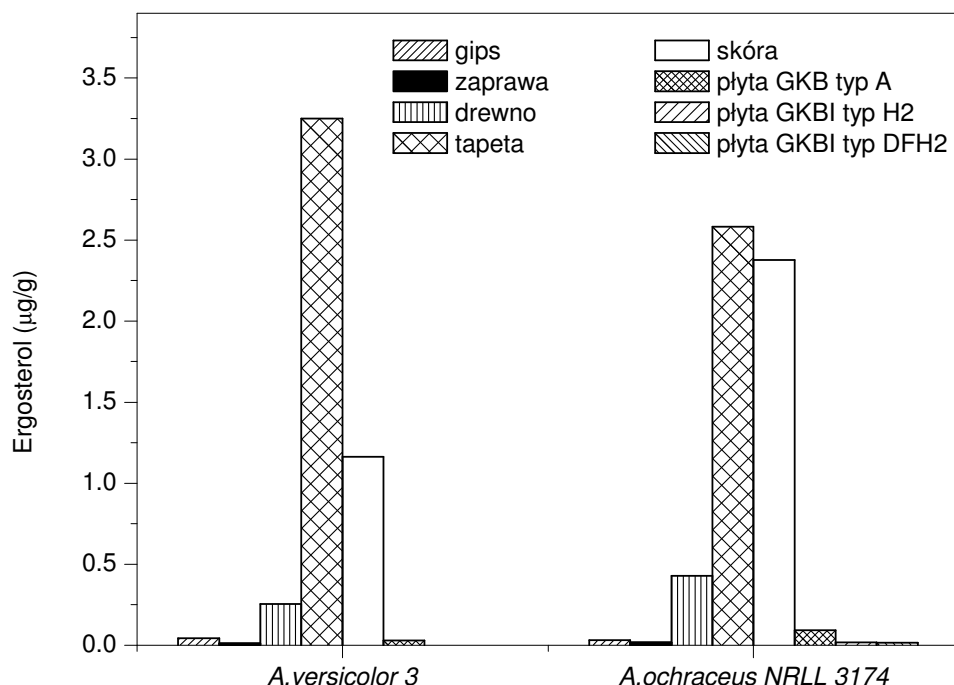
Wykazano wyższość testu immunoblotting nad testami SPT i Elisa, wykorzystawanymi w diagnostyce alergii na grzyby. Test ten charakteryzuje wysoka czułość i specyficzność, pozwalająca na wykrycie alergennych białek pleśni obecnych w pomieszczeniach.

4.2. Badania laboratoryjne

4.2.1. Wzrost grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych – badania modelowe

Aby sprawdzić, jak rosną grzyby strzępkowe na materiałach budowlanych i wykończeniowych o różnym składzie chemicznym (drewno, tapeta, skóra, płyta gipsowo-kartonowa, gips, zaprawa tynkarska) – przeprowadzono laboratoryjne badania modelowe (metodyka p. 3.8). Badano również wzrost pleśni na płytach gipsowo-kartonowych, które zawierają substancje biocydowe i silikon, mające w założeniu ograniczać wzrost pleśni (płyta GKBI typ H2 z dodatkiem biocydu i silikonu oraz GKBI typ DFH2 z biocydem, silikonem i substancją przeciwogniową). Badania prowadzono dla pleśni: *Aspergillus versicolor* 3 – szczep wyizolowany z powłoki malarskiej w budynku zagrzybionym oraz szczep kolekcyjny *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174. Wybór szczepów podyktowany był dobrym wzrostem tych pleśni na powierzchni materiałów budowlanych oraz potwierdzoną toksynotwórczością. Hodowle pleśni prowadzono przez 25 dni,

w temperaturze 27°C, przy korzystnych dla wzrostu grzybów parametrach wilgotności materiałów budowlanych (metodyka p. 3.5) oraz z niewielkim dodatkiem substancji organicznej inicjującej wzrost (1 ml pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym). W trakcie hodowli pobierano próbki materiałów do oznaczania ergosterolu (p. 3.7.3). Na podstawie zawartości ergosterolu wyliczono maksymalną szybkość wzrostu (S_{max}), która występowała w pierwszych dniach rozwoju pleśni, a także szybkość występującą w połowie fazy logarytmicznego wzrostu pleśni ($S_{1/2log}$), opisującą szybkość rozwoju grzybni w warunkach, kiedy nastąpiło wyczerpanie cukrów pochodzących z pożywki, a pleśnie zaczęły korzystać ze źródeł dostępnych w materiale budowlanym. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 20 i przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Zawartość ergosterolu w hodowli *Aspergillus versicolor 3* oraz *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 na materiałach

Tabela 20. Stężenie ergosterolu oraz szybkość wzrostu *Aspergillus versicolor* 3 i *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 podczas hodowli na materiałach

Materiał	Stężenie ergosterolu w materiałach (μg/g) w poszczególnych dniach hodowli					Szybkości wzrostu (μg ergosterolu/g materiału/dobę)	
	3	7	11	18	25	S _{max}	S _{1/2log}
<i>Aspergillus versicolor</i> 3							
Gips	0,009	0,043	0,012	0,006	0,006	0,008	0,002
Zaprawa	0,008	0,012	0,006	0,005	0,004	0,005	0,001
Drewno	0,081	0,101	0,255	0,083	0,082	0,036	0,013
Tapeta	1,089	2,435	1,904	1,431	3,249	0,608	0,207
Skóra	0,462	0,919	1,163	0,469	0,353	0,270	0,063
Płyta g-k GKB typ A	0,022	0,025	0,030	0,027	0,023	0,010	0,003
<i>Aspergillus ochraceus</i> NRLL 3174							
Gips	0,011	0,032	0,016	0,006	0,009	0,008	0,003
Zaprawa	0,011	0,010	0,019	0,015	0,009	0,003	0,001
Drewno	0,167	0,289	0,429	0,270	0,167	0,076	0,028
Tapeta	2,140	2,583	2,731	2,169	1,629	1,550	0,225
Skóra	1,532	1,723	2,127	2,378	2,300	0,738	0,137
Płyta g-k GKB typ A	0,022	0,029	0,054	0,092	0,092	0,011	0,004
Płyta g-k GKBI typ H2	0,010	0,012	0,018	0,008	0,008	0,002	0,001
Płyta g-k GKBI typ DFH2	0,011	0,014	0,015	0,015	0,019	0,002	0,001

Płyta g-k – płyta gipsowo-kartonowa.

Początkowe stężenia ergosterolu w materiałach wynosiły od 0,001 do 0,014 μg/g materiału, w zależności od rodzaju materiału.

Początkowe wilgotności masowe materiałów: gips 68%, zaprawa tynkarska 43%, drewno 220%, tapeta 79%, skóra 181%, Płyta gipsowo-kartonowa 80%.

Koncentracja związków organicznych na powierzchni materiału (wprowadzone z pożywką Mo z ekstraktem drożdżowym) 0,02 g/próbkę o powierzchni 16 cm².

Najwyższe stężenie ergosterolu wykryto pomiędzy 7 a 11 dniem hodowli *Aspergillus versicolor* 3 na tapecie, skórze i drewnie, wynoszące od 0,26 do 3,25 μg/g (Tabela 20). Poziom ten świadczył o aktywnym wzroście grzybni (Rys. 3). Potwierdzeniem jest duża szybkość maksymalna syntezy ergosterolu S_{max} na tych materiałach, na poziomie 0,036-0,608 μg ergosterolu/g/dobę, a także S_{1/2log}

wynosząca 0,013-0,207 μg ergosterolu/g/dobę. Na płycie gipsowo-kartonowej typu A (bez biocydu) oraz na gipsie wzrost tego szczepu był słabszy, o czym świadczy stężenie ergosterolu wynoszące 0,03-0,04 $\mu\text{g/g}$ i szybkość wzrostu na poziomie $S_{\text{max}} = 0,008\text{-}0,01$ μg ergosterolu/g/dobę. Na zaprawie tynkarskiej wzrost pleśni był najniższy: stężenie ergosterolu w 7 dniu hodowli wynosiło 0,012 $\mu\text{g/g}$, a szybkość wzrostu S_{max} była na poziomie 0,005 μg ergosterolu/g/dobę.

Podczas hodowli *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 na tapecie, skórze, drewnie oraz płycie gipsowo-kartonowej typu A stężenie ergosterolu było także wysokie i wynosiło 0,09-2,58 $\mu\text{g/g}$ (Rys. 3). *A. ochraceus* charakteryzował się szybszym wzrostem niż *A. versicolor* 3 (Tabela 20). Na materiałach pochodzenia organicznego szybkość wzrostu *A. ochraceus* osiągała poziom $S_{\text{max}} = 0,076\text{-}1,55$ μg ergosterolu/g/dobę oraz $S_{1/2\log} = 0,028\text{-}0,225$ μg ergosterolu/g/dobę. Materiały mineralne – gips i zaprawa tynkarska – nie były odpowiednim podłożem do wzrostu *A. ochraceus*. Na tych materiałach zawartość ergosterolu wynosiła 0,019-0,032 $\mu\text{g/g}$, natomiast szybkość wzrostu była na poziomie $S_{\text{max}} = 0,003\text{-}0,008$ ergosterolu/g/dobę.

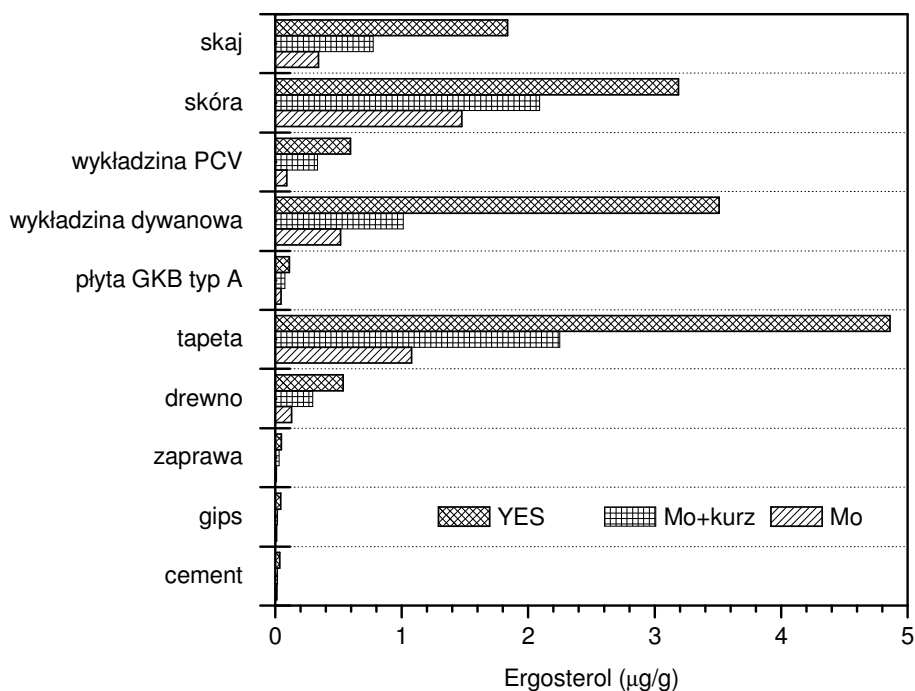
Na płytach gipsowo-kartonowych z dodatkiem biocydu i silikonu (GKBI typ H2 oraz DFH2) stwierdzono brak aktywnego wzrostu pleśni.

Podsumowanie

Potwierdzono w warunkach modelowych dobry wzrost pleśni na materiałach budowlanych i wykończeniowych pochodzenia organicznego, takich jak skóra, drewno, tapeta, płyta gipsowo-kartonowa. Dodatek biocydu i silikonu skutecznie ograniczał wzrost pleśni. Wykazano także spowolniony wzrost pleśni na materiałach nieorganicznych, takich jak gips i zaprawa tynkarska. Wyniki pokazujące zawartość ergosterolu na materiałach nieorganicznych w warunkach modelowych były niezgodne z uzyskanymi dla tych samych rodzajów materiałów w budynkach. W budynkach stwierdzono bowiem dziesięciokrotnie wyższe stężenie ergosterolu na zaprawie i gipsie (rzędu 3,5-11,9 $\mu\text{g}/100\text{ cm}^2$), co po przeliczeniu na masę materiałów odpowiada 0,025-0,126 $\mu\text{g/g}$. Wskazywało to na obecność w budynkach substancji pokarmowych, które są niezbędne dla wzrostu grzybów strzępkowych. Postanowiono zatem zbadać, czy obecność zanieczyszczeń w postaci kurzu oraz większej ilości związków organicznych dostarczonych z pożywką YES może aktywować wzrost pleśni na tych materiałach budowlanych.

4.2.2. Wpływ zanieczyszczeń w postaci kurzu oraz związków organicznych na wzrost grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych

Poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy kurz, który gromadzi się na powierzchniach materiałów budowlanych, jest dla pleśni czynnikiem stymulującym ich rozwój. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu *A. ochraceus* NRLL 3174, którego dobry wzrost obserwowano na wszystkich rodzajach materiałów budowlanych i wykończeniowych. Hodowle prowadzono na materiałach z dodatkiem zanieczyszczeń w postaci kurzu (pożywka Mo z kurzem domowym lekkim, p. 3.3; ilość kurzu: 0,01 g/próbkę materiału o powierzchni 16 cm²), związków organicznych (pożywka YES 0,17 g/próbkę materiału) oraz kontrolnie w obecności tylko związków mineralnych (pożywka Mo). W czasie hodowli prowadzonej w temperaturze i wilgotności sprzyjającej wzrostowi pleśni (metodyka p. 3.5; p. 3.8) pobierano próbki i oznaczano w nich zawartość ergosterolu (p. 3.7.3), następnie wyliczono maksymalną szybkość wzrostu i szybkość w połowie fazy logarytmicznego wzrostu. Wyniki podano w tabeli 21 i przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Zawartość ergosterolu w hodowli *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 na materiałach z dodatkiem pożywki Mo, pożywki Mo z kurzem oraz pożywki YES

Tabela 21. Stężenie ergosterolu oraz szybkość wzrostu *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 podczas hodowli na materiałach z dodatkiem pożywki Mo, pożywki Mo z kurzem oraz pożywki YES

Materiał	Pożywka + dodatek	Stężenie ergosterolu w materiałach (µg/g) w poszczególnych dniach hodowli					Szybkość wzrostu (µg ergosterolu/g materiału/dobę)	
		3	7	11	18	25	S _{max}	S _{1/2log}
Cement	Mo	0,008	0,015	0,012	0,005	0,010	0,005	0,001
	Mo+kurz	0,015	0,015	0,019	0,016	0,013	0,006	0,001
	YES	0,025	0,035	0,035	0,014	0,009	0,012	0,003
Gips	Mo	0,007	0,012	0,009	0,007	0,007	0,004	0,001
	Mo+kurz	0,012	0,017	0,019	0,008	0,008	0,006	0,002
	YES	0,028	0,045	0,027	0,019	0,020	0,010	0,003
Zaprawa	Mo	0,006	0,005	0,007	0,005	0,007	Brak wzrostu	
	Mo+kurz	0,009	0,022	0,031	0,008	0,007	0,005	0,002
	YES	0,012	0,039	0,048	0,023	0,015	0,009	0,003
Drewno	Mo	0,052	0,068	0,130	0,079	0,101	0,025	0,005
	Mo+kurz	0,145	0,154	0,293	0,162	0,132	0,050	0,131
	YES	0,176	0,374	0,486	0,536	0,526	0,072	0,216
Tapeta	Mo	0,347	0,855	1,094	0,882	0,473	0,171	0,072
	Mo+kurz	1,188	1,319	1,904	2,259	1,022	0,284	0,004
	YES	3,002	3,902	4,545	4,860	4,410	1,505	0,006
Płyta g-k GKB typ A	Mo	0,008	0,017	0,025	0,046	0,025	0,004	0,002
	Mo+kurz	0,023	0,026	0,039	0,075	0,067	0,006	0,003
	YES	0,039	0,053	0,112	0,101	0,050	0,014	0,008
Wykładzina dywanowa	Mo	0,394	0,416	0,428	0,518	0,421	0,106	0,025
	Mo+kurz	0,437	0,936	0,992	1,017	0,934	0,200	0,052
	YES	1,980	2,835	3,510	3,294	1,440	0,596	0,257
Wykładzina PCV	Mo	0,059	0,080	0,087	0,090	0,061	0,020	0,005
	Mo+kurz	0,120	0,194	nb	0,335	0,298	0,032	0,014
	YES	0,504	0,596	0,445	0,450	0,383	0,126	0,054
Skóra	Mo	0,553	0,733	1,170	1,476	1,422	0,140	0,063
	Mo+kurz	1,231	1,138	1,967	2,088	2,023	0,216	0,099
	YES	1,890	2,628	3,186	2,376	1,940	0,828	0,211
Skaj	Mo	0,113	0,148	0,301	0,346	0,216	0,039	0,018
	Mo+kurz	nb	0,632	0,769	0,481	0,301	0,164	0,054
	YES	0,432	0,864	1,787	1,829	1,192	0,229	0,095

nb – nie badano, płyta g-k – płyta gipsowo-kartonowa.

Wilgotności masowe materiałów: cement 35%, gips 68%, zaprawa tynkarska 43%, drewno 220%, tapeta 79%, Płyta gipsowo-kartonowa 80%, wykładzina dywanowa 143%, wykładzina PCV 30%, skóra 181%, skaj 70%.

Podczas 21-dniowej hodowli *A. ochraceus* NRLL 3174, bez dodatkowych źródeł węgla organicznego, jedynie na skórze oraz tapecie, oznaczono wysokie stężenia ergosterolu (1,09-1,48 $\mu\text{g/g}$), a maksymalna szybkość jego syntezy osiągała poziom $S_{\text{max}} = 0,140\text{-}0,171 \mu\text{g/g/dobę}$, co wskazywało na aktywny wzrost pleśni (Rys. 4, Tabela 21). Najniższą zawartość ergosterolu (0,007-0,015 $\mu\text{g/g}$) oznaczono w materiałach nieorganicznych (cement, gips, zaprawa); również szybkość syntezy ergosterolu w obecności tych materiałów wskazywała na to, iż są nieodpowiednie dla wzrostu pleśni.

Dodatek kurzu w ilości 0,01 g/próbkę materiału o powierzchni 16 cm^2 , spowodował przyspieszenie wzrostu grzybnii na większości materiałów. Stężenie ergosterolu wzrosło do wartości: 2 $\mu\text{g/g}$ (tapeta i skóra), 0,8-1,0 $\mu\text{g/g}$ (wykładzina dywanowa i skaj), 0,3 $\mu\text{g/g}$ (wykładzina PCV i drewno), 0,1 $\mu\text{g/g}$ (płyta kartonowo-gipsowa) (Rys. 4). Również szybkość syntezy ergosterolu wzrosła o 0,01-0,2 $\mu\text{g/g/dobę}$. Na cemencie, zaprawie i gipsie – mimo obecności kurzu – obserwowano niską zawartość ergosterolu (0,019-0,03 $\mu\text{g/g}$) (Tabela 21).

Dodatek pożywki YES (0,17 g związków organicznych – ekstraktu drożdżowego oraz sacharozy/próbkę materiału) przyspieszył syntezę ergosterolu na wszystkich materiałach, z wyjątkiem cementu. Poziom ergosterolu był najwyższy (3,186-4,860 $\mu\text{g/g}$) (Rys. 4). Nawet w materiałach nieorganicznych (gips, zaprawa) zaobserwowano wyższe o 0,03-0,07 $\mu\text{g/g}$ stężenia ergosterolu, w porównaniu z materiałami z dodatkiem kurzu. Szybkość wzrostu pleśni na materiałach nieorganicznych z dodatkiem pożywki YES była dwukrotnie większa, w porównaniu z podłożem z dodatkiem kurzu, natomiast na materiałach organicznych, takich jak skóra, tapeta – szybkości syntezy ergosterolu były odpowiednio cztero- i dziesięciokrotnie wyższe (Tabela 21).

Podsumowanie

Aktywny wzrost pleśni *Aspergillus ochraceus* zaobserwowano na skórze oraz tapecie, bez dodatku zanieczyszczeń organicznych. Również materiały budowlane organiczne zawierające celulozę (drewno, płyta gipsowo-kartonowa) oraz materiały polimerowe (wykładzina dywanowa, skaj, wykładzina PCV) umożliwiły rozwój pleśni, jednak szybkości wzrostu grzybów na tych materiałach były ograniczone – kilkukrotnie niższe niż na skórze i tapecie. Jeszcze słabszy wzrost obserwowano na materiałach nieorganicznych (cement, gips, zaprawa). Dodatek kurzu na powierzchnię materiału budowlanego (w ilości 0,01 g/próbkę materiału o powierzchni 16 cm^2) stymulował wzrost pleśni na wszystkich materiałach budowlanych pochodzenia celulozowego, polimerowych oraz na zaprawie tynkarskiej. Szybkość wzrostu na materiałach budowlanych z dodatkiem kurzu wzrastała ponad dwukrotnie. Dodatek związków organicznych w postaci pożywki YES znacznie

podwyższył szybkość syntezy ergosterolu na wszystkich materiałach budowlanych. Jedynie cement okazał się materiałem niekorzystnym dla wzrostu pleśni, co było zgodne z wynikami badań środowiskowych. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, iż kurz domowy obecny na powierzchni materiałów budowlanych i wykończeniowych okazał się sprzyjający dla wzrostu pleśni.

W kolejnym etapie badań modelowych zmierzano do określenia wpływu wilgotności materiałów budowlanych na wzrost grzybów strzępkowych.

4.2.3. Wpływ wilgotności materiału budowlanego na wzrost grzybów strzępkowych

Badanie przeprowadzono na trzech rodzajach materiałów – tapecie, gipsie oraz zaprawie tynkarskiej pokrytej farbą emulsyjną, inkubowanych z dodatkiem pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym dla zainicjowania wzrostu pleśni. W materiałach zastosowano różne poziomy wilgotności masowej, począwszy od najniższej do najwyższej, możliwej do uzyskania (metodyka p. 3.5). Hodowle pleśni *Aspergillus flavus* KA 30, *A. ochraceus* NRLL3174, *A. niger*, *Penicillium expansum* oraz *Trichoderma viride* prowadzono w czasie 41 dni, w temperaturze 27°C. Próbkę materiałów do ekstrakcji ergosterolu pobierano w różnych dniach hodowli, w zależności od materiału i rodzaju grzyba. Na podstawie zawartości ergosterolu wyliczono maksymalną szybkość wzrostu (S_{\max}). Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 22 i przedstawiono na rysunku 5.

Tabela 22. Stężenie ergosterolu oraz szybkość wzrostu pleśni na materiałach budowlanych o różnym poziomie wilgotności masowej

Hodowla <i>Aspergillus flavus</i> KA 30 na tapecie					
Wilgotność masowa (%)	Czas hodowli (dni)				Maksymalna szybkość wzrostu S_{\max} (μg ergosterolu/g materiału/dobę)
	3	7	11	25	
	Stężenie ergosterolu ($\mu\text{g/g}$)				
18	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0
79	0,261	0,355	0,302	0,252	0,166
123	2,615	2,664	2,012	1,224	2,785
165	1,525	1,931	2,313	0,747	0,625
185	1,255	1,562	2,052	0,554	0,445

Tabela 22 (cd.)

Hodowla <i>Aspergillus ochraceus</i> NRLL 3174 na tapecie							
Wilgotność masowa (%)	Czas hodowli (dni)						Maksymalna szybkość wzrostu S_{\max} (μg ergosterolu/g materiału/dobę)
	3	7	11	18	25	33	
	Stężenie ergosterolu ($\mu\text{g/g}$)						
18	0	0	0	0	0	0	0
56	1,008	1,908	2,268	1,481	1,219	0,855	0,535
79	2,097	2,295	1,917	1,269	1,098	1,440	1,309
123	0,914	1,359	1,440	1,125	0,661	1,395	0,468
165	0,374	0,432	nb	0,418	0,122	nb	0,126
185	0,342	0,360	nb	0,369	0,040	nb	0,095
Hodowla <i>Aspergillus niger</i> na gipsie							
Wilgotność masowa (%)	Czas hodowli (dni)					Maksymalna szybkość wzrostu S_{\max} (μg ergosterolu/g materiału/dobę)	
	7	13	20	34	41		
	Stężenie ergosterolu ($\mu\text{g/g}$)						
17	0	0	0	0	0	0	
33	0,030	0,037	0,029	0,014	0,013	0,009	
48	0,036	0,055	0,034	0,031	0,015	0,010	
68	0,045	0,057	0,044	0,049	0,022	0,011	
Hodowla <i>Penicillium expansum</i> na gipsie							
Wilgotność masowa (%)	Czas hodowli (dni)					Maksymalna szybkość wzrostu S_{\max} (μg ergosterolu/g materiału/dobę)	
	7	13	20	34	41		
	Stężenie ergosterolu ($\mu\text{g/g}$)						
17	0	0	0	0	0	0	
33	0,022	0,027	0,039	0,029	0,018	0,034	
48	0,041	0,029	0,032	0,029	0,015	0,037	
68	0,035	0,053	0,055	0,040	0,019	0,066	

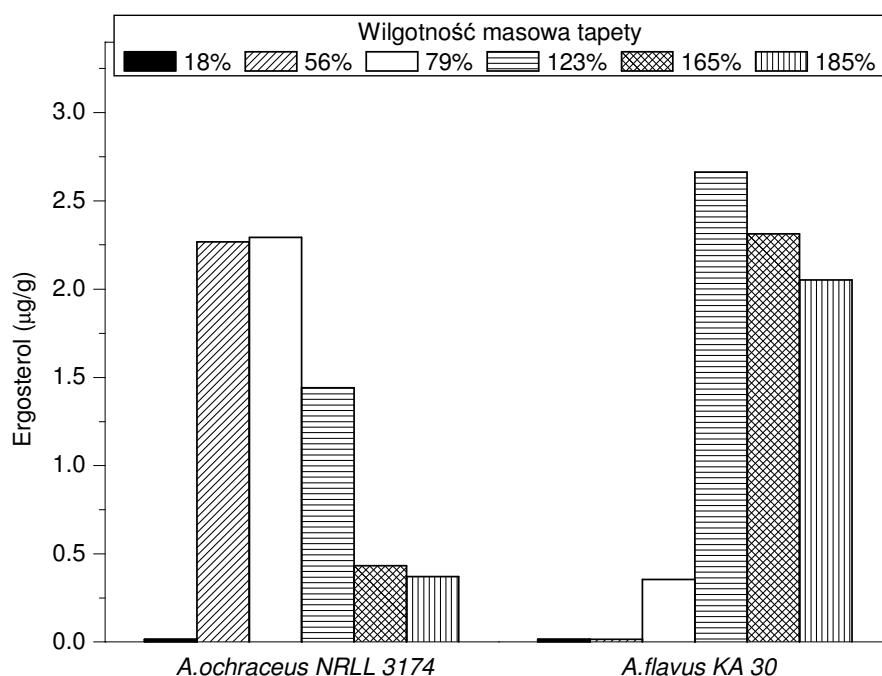
Hodowla <i>Penicillium expansum</i> na zaprawie tynkarskie pokrytej farbą emulsyjną						
Wilgotność masowa (%)	Czas hodowli (dni)					Maksymalna szybkość wzrostu S_{\max} (μg ergosterolu/g materiału/dobę)
	7	13	20	34	41	
	Stężenie ergosterolu (μg/g)					
4	0	0	0	0	0	0
5	0,016	0,031	0,033	0,019	0,017	0,004
7	0,026	0,045	0,029	0,022	0,07	0,006
11	0,032	0,037	0,038	nb	0,010	0,007
Hodowla <i>Trichoderma viride</i> na zaprawie tynkarskie pokrytej farbą emulsyjną						
Wilgotność masowa (%)	Czas hodowli (dni)					Maksymalna szybkość wzrostu S_{\max} (μg ergosterolu/g materiału/dobę)
	7	13	20	34	41	
	Stężenie ergosterolu (μg/g)					
4	0	0	0	0	0	0
5	0,021	0,028	0,028	0,018	0,008	0,004
7	0,024	0,031	0,031	0,019	0,014	0,005
11	0,03	0,036	0,034	0,026	0,001	0,007

nb – nie badano

Stężenie związków organicznych na powierzchni materiału, dostarczane z pożywką Mo z ekstraktem drożdżowym – 0,02 g ekstraktu / próbkę o powierzchni 16cm².

Najwyższe stężenie ergosterolu (2,29-2,66 $\mu\text{g/g}$) oraz jego najszybsze wytwarzanie (1,3-2,8 $\mu\text{g/g/dobę}$) przez *A. flavus* obserwowano na tapecie o wilgotności masowej 123%, natomiast w hodowli *Aspergillus ochraceus* już na tapecie o wilgotności 79% (Tabela 22, Rys. 5). W hodowlach *A. flavus* i *A. ochraceus* na tapecie o wilgotności masowej 18% oraz w hodowli *A. flavus* na tapecie o wilgotności 56% nie wykryto obecności ergosterolu, co świadczy o braku wzrostu pleśni. Zaobserwowano, iż szybkość syntezy ergosterolu przez *A. flavus* na tapecie zwiększyła się o 0,8 $\mu\text{g/g/dobę}$ wraz ze wzrostem wilgotności masowej z 56% do 79%, oraz o 2,6 $\mu\text{g/g/dobę}$ wraz ze wzrostem wilgotności z 79% do 123%. Przy wyższych wartościach wilgotności masowej tapety (165% i 185%) synteza ergosterolu była spowolniona ($S_{max} = 0,095\text{-}0,625 \mu\text{g/g/dobę}$).

Na materiałach nieorganicznych, takich jak gips i zaprawa tynkarska pokryta farbą emulsyjną, zaobserwowano, iż badane pleśnie nie były aktywne, jeżeli wilgotność masowa materiałów nie przekraczała 4% (zaprawa) i 17% (gips). Przy wyższych poziomach wilgotności masowej obserwowano słaby rozwój pleśni, stężenie ergosterolu nie przekraczało 0,057 $\mu\text{g/g}$.



Rys. 5. Zawartość ergosterolu w hodowli pleśni *Aspergillus flavus* KA 30, *Aspergillus ochraceus* NRLL3174 na tapecie o różnej wilgotności masowej

Podsumowanie

Wykazano istotny wpływ wilgotności masowej materiałów budowlanych na wzrost pleśni. Najwyższy poziom i najszybsza synteza ergosterolu miała miejsce przy wilgotności masowej tapety 79-123%. Szybkość tworzenia ergosterolu rosła wraz ze wzrostem wilgotności masowej do 123% i obniżała się przy wilgotności powyżej 165%. Na materiałach nieorganicznych zawartość ergosterolu była znacznie niższa. Na zaprawie zaobserwowano wzrost pleśni przy wilgotności masowej równej 5%. W przypadku gipsu wzrost pleśni występował przy poziomie 33% wilgotności.

Badane szczepy odmiennie reagowały na wilgotność masową materiałów budowlanych. *Aspergillus flavus* aktywnie rozwijał się dopiero przy wilgotności tapety 79%, natomiast wzrost *Aspergillus ochraceus* obserwowano już przy wilgotności 56%.

W kolejnych etapach badań zmierzano do ustalenia, czy pleśnie zdolne są do syntezy mikotoksyn podczas wzrostu na materiałach budowlanych i wykończeniowych oraz jak na tę syntezę wpływa zanieczyszczenie materiałów w postaci kurzu domowego o poziom wilgotności.

4.2.4. Mikotoksyny w materiałach budowlanych

W wymazach z przegród budowlanych w zagrzybionych mieszkaniach nie wykazano obecności mikotoksyn. Jednak pleśnie wyizolowane z przegród budowlanych, po przeniesieniu grzybów na pożywkę YES, były zdolne do tworzenia mikotoksyn (aflatoksyny B₁, ochratoksyny A, sterigmatocystyny). Postanowiono więc sprawdzić jak kształtuje się ta cecha w warunkach hodowli laboratoryjnych na dwóch rodzajach materiałów budowlanych – płycie gipsowo-kartonowej i zaprawie tynkarskiej. Ocenę zdolności toksynotwórczych prowadzono w odniesieniu do wyników na pożywce kontrolnej MEA. W badaniach wykorzystano grzyby wyizolowane z zagrzybionych pomieszczeń i sklasyfikowane jako toksynotwórcze oraz *Penicillium chrysogenum* i *Cladosporium cladosporioides*, dla których nie wykazano tworzenia toksyn (metoda TLC).

Dla zapoczątkowania rozwoju grzybni, na powierzchnię materiałów budowlanych nanoszono 1 ml pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym. W trakcie 21-dniowej hodowli, w temperaturze 27°C, utrzymywano wilgotność materiału na poziomie korzystnym dla wzrostu pleśni. Po hodowli, z wysuszonych materiałów ekstrahowano mikotoksyny i analizowano metodą HPLC-MS/MS (metodyka p. 3.9.3).

Dodatkowo badaniom poddano szczepy kolekcyjne *Aspergillus ochraceus* NRLL3174 i *Aspergillus flavus* KA30 zdolne do syntezy ochratoksyny A i aflatoksyny B₁. Badania syntezy toksyn przez szczepy kolekcyjne przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną Elisa (metodyka p. 3.9.2). Wzrost szczepów na materiałach budowlanych kontrolowano w oparciu o pomiar ergosterolu. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabelach 23 i 24.

Tabela 23. Mikotoksyny wytwarzane przez grzyby strzępkowe na materiałach budowlanych i podłożu MEA po 21 dniach hodowli

Grzyby strzępkowe	Mikotoksyna	Stężenie mikotoksyn (µg/kg)		
		płyta gipsowo-kartonowa	zaprawa tynkarska	pożywka MEA
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Stachybotrylaktam	2584	1312	156800
<i>Aspergillus versicolor</i> 1	Sterigmatocystyna	136	81,6	34080
	Wiridikatyna	588	97,6	637,6
	Tentoksyna	0	1,26	0
<i>Aspergillus versicolor</i> 2	Sterigmatocystyna	480	124,8	94400
	Wiridikatyna	722,4	130	380
	Tentoksyna	0	10,1	0

Tabela 23 (cd.)

<i>Aspergillus versicolor</i> 3	Sterigmatocystyna	60,5	42,6	49760
	Wiridikatyna	368	31,3	5384
	Kwas kojowy	0	0	542,4
	Awenacina Y	0	0	624,8
	Tentoksyna	0	1,1	0
<i>Aspergillus niger</i>	Wiridikatyna	20,7	0	120
	Kwas kojowy	0	0	793,6
	Kwas penicylinowy	0	30,8	20
<i>Aspergillus flavus</i>	Kwas kojowy	541,6	143,2	637600
	Aflatoksyna G ₁	10,6	12,4	17120
	Aflatoksyna G ₂	0	0	1160
	Aflatoksyna B ₁	7,1	1,64	5800
	Aflatoksyna B ₂	0	0	291,2
	Aflatoksyna M ₁	0	0	552
	Kwas penicylinowy	0	0	15
	Wiridikatyna	3	0	32
	Kwas 3-nitropropionowy	22320	86,4	0
<i>Aspergillus ochraceus</i> 1	Kwas penicylinowy	2400	0	39000
	Wiomeleina	6856	0	72400
<i>Aspergillus ochraceus</i> 2	Wiomeleina	459,2	0	7208
	Wiridikatyna	0	0	11,12
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Meleagrina	13600	728	31520
	Rokefortyna C	1056	100	2568
	Kwas sekalonowy	0	0	29400
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Brak syntezy	-	-	-

Tabela 24. Stężenie ergosterolu w materiałach budowlanych po 21 dniach hodowli grzybów strzępkowych

Grzyby strzępkowe	Stężenie ergosterolu (µg/g)	
	płyta gipsowo-kartonowa	zaprawa tynkarska
<i>Stachybotrys chartarum</i>	0,177	0,016
<i>Aspergillus versicolor</i> 1	0,058	0,022
<i>Aspergillus versicolor</i> 2	0,097	0,024
<i>Aspergillus niger</i>	0,083	0,019
<i>Aspergillus flavus</i>	0,070	0,017
<i>Aspergillus ochraceus</i> 2	0,053	0,023
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,140	0,038
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,090	0,029

Stężenie związków organicznych na powierzchni materiału na początku hodowli, dostarczane z pożywką Mo z ekstraktem drożdżowym – 0,02 g / próbkę o powierzchni 16cm².

Wilgotność masowa materiałów: zaprawa tynkarska 43%, płyta gipsowo-kartonowa 80%.

Wykazano, iż grzyby strzępkowe, pomimo że, nie produkowały mikotoksyn w pomieszczeniach mieszkalnych – zachowały tę właściwość i ujawniły ją nie tylko w hodowli na pożywce, ale również na materiałach budowlanych, pod warunkiem jednak obecności związków organicznych (Tabela 23). Największe ilości mikotoksyn produkował *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* (szczep 1, 2) *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum* i *Aspergillus versicolor* (szczep 1, 2, 3). *Aspergillus niger* charakteryzował się niewielką toksynotwórczością, natomiast *Cladosporium cladosporioides* nie wytwarzał mikotoksyn w badanych warunkach.

Stachybotrys chartarum aktywnie rósł na płycie gipsowo-kartonowej, o czym świadczy zawartość ergosterolu (0,177 µg/g), natomiast na zaprawie tynkarskiej wzrost tego grzyba był słaby (Tabela 24). W badaniach wstępnych na podłożu YES, prowadzonych metodą TLC, nie udało się określić rodzaju mikotoksyny wytwarzanej przez ten szczep; na obecnym etapie ustalono, iż jest to stachybotrylaktam. Najwyższe stężenie tej mikotoksyny obserwowano na pożywce MEA (156800 µg/kg); na materiałach budowlanych było ono stukrotnie niższe.

Szczepy *Aspergillus versicolor* 1 i 2 podczas wzrostu na płycie gipsowo-kartonowej wytwarzały ergosterol w ilości 0,058 i 0,097 µg/g, a na zaprawie 0,022 i 0,024 µg/g, co świadczy o ich słabszym wzroście, niż *S. chartarum*. Podczas doświadczeń środowiskowych potwierdzono zdolność tworzenia sterigmatocystyny na podłożu YES przez wszystkie szczepy tego gatunku. Analiza metodą HPLC–MS/MS, oprócz sterigmatocystyny, wykazała obecność wiridikaty, tentoksyny, kwasu kojowego i awenacyny. Stwierdzono ponadto, że zależnie od szczepu i warunków hodowli *A. versicolor* produkował różne toksyny w ilościach od 1,26 do 94400 µg/kg. Szczep wyizolowany z płyty gipsowo-kartonowej w zagrzybionym budynku – *A. versicolor* 3 syntezował pięć różnych mikotoksyn, podczas gdy inne szczepy tylko po trzy toksyny. Największe ilości sterigmatocystyny i wiridikaty wytwarzał szczep *A. versicolor* 2 wyizolowany w badaniach środowiskowych z tapety.

Aspergillus flavus, mimo słabszego wzrostu (stężenie ergosterolu w warunkach wzrostu pleśni na płycie gipsowo-kartonowej wynosiło 0,070 µg/g, na zaprawie 0,017 µg/g), aktywnie syntetyzował mikotoksyny. Poza aflatoksyną B₁, wykrytą na podłożu YES na etapie badań środowiskowych, zidentyfikowano jeszcze aflatoksynę G₁, G₂, B₂, M₁, wiridikaty, kwas kojowy, kwas penicylinowy i kwas 3-nitropropionowy. Stwierdzono, iż rosnąc na materiałach budowlanych *A. flavus* syntetyzował tylko niektóre mikotoksyny: aflatoksyny B₁, G₁, kwas kojowy i kwas 3-nitropropionowy.

Aspergillus ochraceus 2 rósł słabo na płycie gipsowo-kartonowej i zaprawie, stężenie ergosterolu było na poziomie 0,023 i 0,05 µg/g. W badaniach środowiskowych wykryto, że szczepy *A. ochraceus* 1 i 2 tworzyły toksyny, jednak nie udało się określić ich rodzaju. W obecnych badaniach okazało się, iż szczepy te są producentami kwasu penicylinowego, wiomeleiny i wiridikatyny.

Penicillium chrysogenum sklasyfikowany jako nietoksynotwórczy w badaniach środowiskowych wytwarzał meleagrinę i rokefortynę C podczas wzrostu na materiałach budowlanych i pożywce MEA oraz kwas sekalonowy – na podłożu MEA. Na płycie gipsowo-kartonowej tworzył meleagrinę i rokefortynę C w stężeniu wysokim, zaledwie tylko 2-3 razy niższym, niż na pożywce MEA (Tabela 23).

Porównując produkcję mikotoksyn w warunkach wzrostu grzybów strzępkowych na płycie gipsowo-kartonowej, zaprawie tynkarskiej oraz pożywce MEA stwierdzono, iż pleśnie wyizolowane z budynków mieszkalnych tworzyły najwięcej różnych mikotoksyn i w największym stężeniu na podłożu kontrolnym MEA. Stężenie mikotoksyn na płycie gipsowo-kartonowej było mniejsze, w zależności od szczepu i rodzaju mikotoksyny od 0,2 do 10000 razy (najczęściej o 100), natomiast na zaprawie od 6,5 do 100000 razy (najczęściej o 1000) mniejsze niż na podłożu MEA. Szczepy jednak zachowały zdolność do wytwarzania wielu mikotoksyn podczas wzrostu na materiałach budowlanych, np. sterigmatocystyny, wiridikatyny, kwasu kojowego, aflatoksyny G₁, B₁, kwasu penicylinowego, wiomeleiny, meleagriny, rokefortyny C. Stwierdzono, że różnorodność mikotoksyn była większa oraz ich stężenie było wyższe na płycie gipsowo-kartonowej niż na zaprawie. Podobnie – wzrost pleśni na płycie gipsowo-kartonowej był lepszy niż na zaprawie tynkarskiej, na co wskazuje stężenie ergosterolu wytwarzanego przez pleśnie.

Zaobserwowano także, że niektóre toksyny są tworzone jedynie na materiałach budowlanych. Przykładem jest tentoksyna wytwarzana przez *Aspergillus versicolor* podczas wzrostu na zaprawie oraz kwas 3-nitropropionowy tworzony przez *Aspergillus flavus* – na zaprawie i płycie gipsowo-kartonowej; nie wykryto tych toksyn podczas wzrostu na podłożu kontrolnym MEA. Zaobserwowano ponadto zwiększoną syntezę kwasu penicylinowego przez *A. niger* rosnący na zaprawie niż na podłożu kontrolnym.

Szczepy kolekcyjne wytwarzały około 1000 razy mniej ochratoksyny A i aflatoksyny B₁ podczas wzrostu na płycie gipsowo-kartonowej i zaprawie tynkarskiej, niż na podłożu MEA. Ponadto wytwarzały 2-5 razy więcej mikotoksyn, rosnąc na płycie gipsowo-kartonowej, niż na zaprawie (Tabela 25), podobnie jak gatunki wyizolowane ze środowiska budowlanego.

Tabela 25. Stężenie ochratoksyny A wytworzonej przez *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 oraz aflatoksyny B₁ przez *Aspergillus flavus* KA30 rosnące na materiałach budowlanych i podłożu MEA po 21 dniach hodowli

Podłoże wzrostu	Stężenie mikotoksyny (µg/kg)*	
	Ochratoksyna A	Aflatoksyna B ₁
Płyta gipsowo-kartonowa	X: 9,86; S:0,38	X: 5,42; S: 1,15
Zaprawa tynkarska	X: 5,29; S: 0,18	X: 1,21; S: 0,05
Pożywka MEA	X: 4229; S: 338	X: 2945; S: 294,9

*oznaczenie metodą Elisa; X – wartość średnia, S – odchylenie standardowe.

Udowodniono, że produkcja określonych mikotoksyn jest cechą szczepową. *Aspergillus ochraceus* wyizolowany ze środowiska budowlanego nie syntezował ochratoksyny A, jedynie kwas penicylinowy, wiomeleinę oraz wiridikatynę (Tabela 23), natomiast szczep kolekcyjny tego gatunku w tych samych warunkach wytwarzał ochratoksynę A (Tabela 25). Porównując szczepy *Aspergillus flavus*, kolekcyjny oraz izolat z przegrody budowlanej, stwierdzono, iż oba produkowały aflatoksynę B₁, jednak w różnych stężeniach. Na podłożu MEA szczep kolekcyjny wytwarzał dwa razy mniej aflatoksyny B₁ (2945 µg/kg) niż izolat z budynku (5800 µg/kg). Na materiałach budowlanych szczep kolekcyjny i wyizolowany ze środowiska budowlanego produkował zbliżone ilości aflatoksyny B₁.

Podsumowanie

Stwierdzono, iż szczepy sklasyfikowane we wstępnych badaniach jako toksynotwórcze na podłożu YES, wykazują tę właściwość, zarówno podczas wzrostu na pożywce MEA, jak również na płycie gipsowo-kartonowej oraz zaprawie tynkarskiej. Pleśnie *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* 1 i 2, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum* oraz *Aspergillus versicolor* 1, 2 i 3 syntetyzowały po kilka różnych toksyn i w wysokich stężeniach. *Aspergillus niger* wytwarzał trzy różne mikotoksyny, jednak w znacznie mniejszych ilościach, natomiast *Cladosporium cladosporioides* nie syntetyzował mikotoksyn. Do najgroźniejszych pod względem zdrowotnym mikotoksyn produkowanych przez pleśnie rosnące na pożywce MEA i materiałach budowlanych należą aflatoksyny G₁, B₁, M (*A. flavus*), sterigmatocystyna (*A. versicolor*), rokefortyna C i meleagrina (*P. chrysogenum*).

Pomimo, iż w badaniach środowiskowych nie wykazano obecności mikotoksyn na przegrodach budowlanych, jednak wyniki niniejszych badań jednoznacznie wykazały, iż szczepy wyizolowane z mieszkań mają zdolność do wytwarzania wielu mikotoksyn podczas wzrostu na materiałach budowlanych. Świadczy to o możliwości występowania mikotoksyn w budynkach mieszkalnych. Wykazano

ponadto, że płyta gipsowo-kartonowa bardziej sprzyjała syntezie toksyn, niż zaprawa tynkarska.

Udowodniono także, iż badane materiały budowlane mogą stymulować produkcję niektórych mikotoksyn – tentoksyny i kwasu 3-nitro-propionowego, których obecności nie stwierdzono po 21 dniach wzrostu pleśni na podłożu kontrolnym MEA. Wyniki te wskazują na konieczność badania właściwości toksynotwórczych pleśni wyizolowanych z budynków na materiałach budowlanych.

Porównując szczepy tego samego gatunku wyizolowane z różnych miejsc w budynkach oraz szczepy wzorcowe, wykazano istotne różnice w ilości oraz rodzaju tworzonych mikotoksyn. Wśród trzech badanych izolatów *A. versicolor*, szczep 3 produkował różne mikotoksyny, natomiast szczep 2 syntetyzował najwięcej sterigmatocystyny. Jeszcze większe różnice odnotowano, porównując szczep kolekcyjny *A. ochraceus* NRLL 3174 oraz szczep tego gatunku, wyizolowany z budynku, który wytwarzał zupełnie inne mikotoksyny.

4.2.5. Cytotoksyczność i genotoksyczność materiałów budowlanych porażonych przez grzyby strzępkowe

Hodowle pleśni prowadzono na płycie gipsowo-kartonowej, zaprawie tynkarskiej oraz pożywce MEA przez 21 dni, w temperaturze 27°C, w warunkach korzystnej dla wzrostu wilgotności. Próbkę materiałów budowlanych oraz podłoża porośnięte przez pleśń poddano ekstrakcji, cytotoksyczność ogólną ekstraktów oznaczano metodą XTT (metodyka p. 3.10), a genotoksyczność metodą MLA (metodyka p. 3.11). Badania przeprowadzono dla siedmiu szczepów wyizolowanych z budynków (reprezentujących poszczególne gatunki) oraz dwóch szczepów kolekcyjnych. Celem tego etapu badań było sprawdzenie, czy materiały budowlane, na których rozwijały się pleśnie wykazują cytotoksyczność i genotoksyczność oraz czy jest to związane z wytwarzanymi mikotoksynami. Oznaczano także cytotoksyczność roztworów czystych preparatów aflatoksyny B₁ i sterigmatocystyny wobec komórek fibroblastów w teście XTT. Cytotoksyczność (IC₅₀) aflatoksyny B₁ wynosiła 6,5 µg/ml, a sterigmatocystyny 20 µg/ml. Były to wartości odniesienia, do których porównywano cytotoksyczność prób materiałów budowlanych oraz pożywki MEA porośniętej przez pleśń.

Ekstrakty z pożywki MEA porośniętej przez izolaty pleśni pochodzących z budynków mieszkalnych: *A. versicolor* 2, *A. flavus*, *P. chrysogenum* oraz przez szczep kolekcyjny *A. ochraceus* NRLL 3174 wykazywały wysoką cytotoksyczność, porównywalną z cytotoksycznością czystych roztworów mikotoksyn (Tabela 26).

Tabela 26. Cytotoksyczność i genotoksyczność materiałów budowlanych oraz pożywki MEA po 21 dniach hodowli grzybów strzępkowych

Grzyby strzępkowe/próbki kontrolne	Cytotoksyczność (test XTT)			Genotoksyczność (test MLA)
	płyta gipsowo-kartonowa	zaprawa tynkarska	MEA	
<i>Stachybotrys chartarum</i>	–	–	–	Nie wykazano genotoksyczności żadnej z analizowanych prób
<i>Aspergillus versicolor</i> 2	++	++	+++	
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	–	
<i>Aspergillus flavus</i>	++	++	+++	
<i>Aspergillus ochraceus</i> 1	–	–	–	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	++	++	+++	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	–	–	–	
<i>Aspergillus ochraceus</i> NRLL 3174	++	–	+++	
<i>Aspergillus flavus</i> KA30	–	–	++	
Próbka kontrolna brak wzrostu grzybów	–	–	–	
Próbka kontrolna, aflatoksyna B ₁ ¹	+++ (IC ₅₀ 6,5 µg/ml)			(–)
Próbka kontrolna, sterigmatocystyna ¹	+++ (IC ₅₀ 20 µg/ml)			(–)

+++ cytotoksyczność wysoka, porównywalna z dodatnią próbą kontrolną (IC₅₀: 6,5 -20 µg/ml).

++ cytotoksyczna średnia (IC₅₀: 20 -100 µg/ml).

+ cytotoksyczność niska (IC₅₀: 100 - 200 µg/ml).

– brak efektu cytotoksycznego (IC₅₀: >200 µg/ml).

genotoksyczność: (+) > 50% komórek mutantów; (–) < 50% komórek mutantów (o gęstości 1×10⁶).

¹ stężenie standardów mikotoksyn: aflatoksyny B₁: 100 µg/ml, sterigmatocystyny: 20 µg/ml.

Średnią cytotoksyczność oznaczono w przypadku płyty gipsowo-kartonowej oraz zaprawy tynkarskiej, porośniętej przez *Aspergillus versicolor* 2. Również materiały budowlane porażone przez *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* oraz pożywka MEA porośnięta przez szczep kolekcyjny *Aspergillus flavus* KA 30 wykazywały średnią cytotoksyczność.

Nie obserwowano cytotoksyczności materiałów budowlanych i podłoża MEA porośniętego przez *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus ochraceus* 1 – zatem stachybotrylaktam, wiomeleina i kwas penicylinowy w wytworzonych stężeniach nie są cytotoksyczne wobec fibroblastów mysich. Nie wykazano również cytotoksyczności szczepów *Aspergillus niger* i *Cladosporium cladosporioides*, co potwierdza rolę mikotoksyn w oddziaływaniu toksycznym na komórki organizmów wyższych (*A. niger* produkował niewiele mikotoksyn i w niskim stężeniu, *C. cladosporioides* nie produkował żadnych mikotoksyn).

Ekstrakty zaprawy porośniętej przez toksynotwórcze szczepy kolekcyjne: *A. ochraceus* NRLL 3174 oraz *A. flavus* KA 30 nie były cytotoksyczne, ze względu na słaby wzrost w tym środowisku.

Wykazano, iż cytotoksyczność materiałów budowlanych porażonych przez pleśń jest niższa, niż podłoża MEA, porośniętego przez te same gatunki grzybów. Bardziej cytotoksyczne były ekstrakty płyty gipsowo-kartonowej, niż zaprawy tynkarskiej, co było skorelowane z rodzajem i stężeniem tworzonych mikotoksyn oraz wzrostem pleśni.

Test MLA wykazał brak genotoksyczności zarówno materiałów budowlanych, jak i podłoża MEA porośniętego przez pleśń wyizolowane ze środowiska budowlanego oraz szczepy kolekcyjne. Nie wykazano również genotoksyczności standardowych roztworów mikotoksyn: aflatoksyny w stężeniu 100 µg/ml i sterigmatocystyny (20 µg/ml) (Tabela 26).

Ze względu na fakt, że w niektórych (3%) wymazach z przegród budowlanych w budynkach mieszkalnych nie wykryto obecności mikotoksyn, a wykazano ich cytotosyczność (wyniki badań środowiskowych – Tabela 17) postanowiono zbadać czy czyste materiały budowlane są cytotoksyczne. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 27.

Tabela 27. Cytotoksyczność materiałów budowlanych i wykończeniowych

Materiał budowlany/wykończeniowy	Cytotoksyczność w teście XTT
Cement	+
Gips	–
Zaprawa klejąca	–
Drewno	–
Tapeta	–
Płyta gipsowo-kartonowa	–
Wykładzina dywanowa	–
Wykładzina PCV	–
Skóra	+
Skaj	–

+ cytotoksyczność niska, – brak efektu cytotoksycznego.

Wyniki badań dowodzą, iż niektóre czyste materiały budowlane i wykończeniowe (cement i skóra) są w niskim stopniu cytotoksyczne wobec komórek fibroblastów mysich (Tabela 27).

Podsumowanie

Wykazano, iż materiały budowlane porażone przez pleśnie *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* oraz szczepy kolekcyjne *Aspergillus flavus* i *Aspergillus ochraceus* oddziałują cytotoksycznie na komórki fibroblastów mysich. Wysoka cytotoksyczność koreluje z ilością i rodzajem syntetyzowanych mikotoksyn. Najbardziej cytotoksyczne okazały się materiały budowlane, w których pleśnie tworzyły sterigmatocystynę, wiridikatyne, aflatoksyny B₁, G₁, rokefortynę C, meleagrinę oraz ochratoksynę A.

Cytotoksyczność materiałów budowlanych porażonych pleśniami jest znacznie wyższa, niż czystych preparatów mikotoksyn, pomimo obecności mikotoksyn w niższych stężeniach. Może to wynikać z synergistycznego oddziaływania toksyn i obecności innych metabolitów wytwarzanych przez pleśnie na materiałach budowlanych, których nie wykryto zastosowanymi metodami.

Ponadto niektóre materiały budowlane i wykończeniowe (czyste, bez rozwoju pleśni), takie jak cement i skóra mogą być również cytotoksyczne wobec fibroblastów mysich.

Nie wykazano genotoksyczności (test MLA) ani materiałów budowlanych porażonych przez pleśnie, ani standardowych roztworów mikotoksyn w stężeniach od 20 do 100 µg/ml.

Wyniki badań omawianych w tym rozdziale uzyskano w doświadczeniach modelowych, prowadzonych w określonych warunkach temperatury, wilgotności materiału i wzbogacenia materiału dodatkiem pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym. Nie odzwierciedla to oddziaływania wszystkich czynników, które mogą mieć wpływ na rozwój grzybów oraz ich właściwości toksynotwórcze. Próbę ustalenia wpływu innych czynników podjęto w badaniach opisanych w kolejnym rozdziale, w którym przedstawiono wyniki badań zależności między rodzajem materiału budowlanego oraz wilgotnością i dostępnością materii organicznej w postaci kurzu domowego a syntezą mikotoksyn.

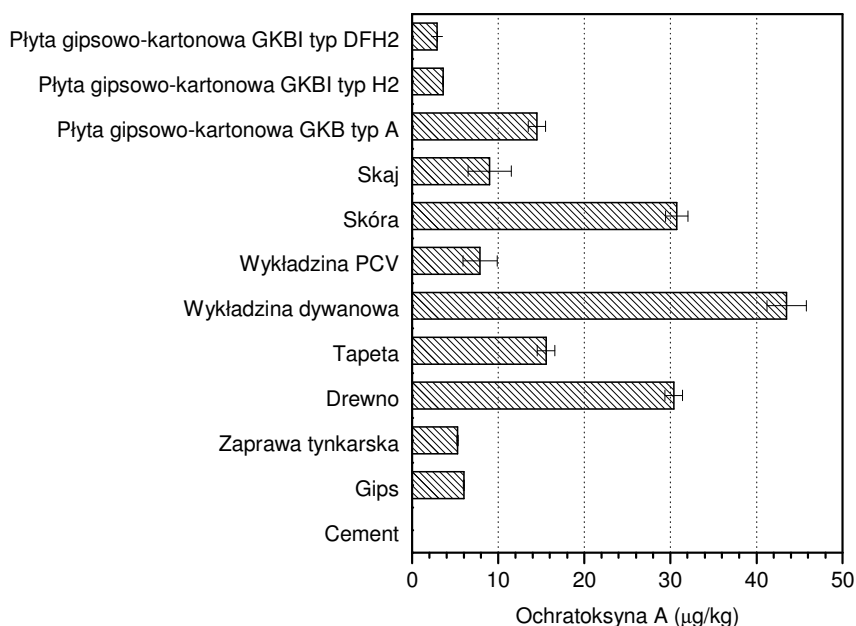
4.2.6. Wpływ rodzaju materiału budowlanego, wilgotności oraz obecności zanieczyszczeń na tworzenie mikotoksyn na materiałach budowlanych

Badano stężenia wytworzonej ochratoksyny A przez *A. ochraceus* NRLL 3174 oraz sterigmatocystyny przez *A. versicolor* 3 (izolat z budynku) na materiałach pochodzenia organicznego, zawierających celulozę, jak również materiałach polimerowych, nieorganicznych oraz płytach gipsowo-kartonowych z dodatkiem biocydu i silikonu. Pleśnie inkubowano przez 21 dni w warunkach wysokiej wilgotności materiałów oraz z dodatkiem podłoża Mo z ekstraktem drożdżowym.

Stężenie ochratoksyny oznaczano metodą Elisa, a sterigmatocystyny metodą TLC. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 6 oraz w tabeli 28.

Szczep *A. ochraceus* NRLL 3174 tworzył najwięcej ochratoksyny A (powyżej 30 ppb), na wykładzinie dywanowej, drewnie oraz skórze (Rys. 6). Wysokie koncentracje OTA (rzędu 15 $\mu\text{g/kg}$) zaobserwowano również na tapecie i płycie gipsowo-kartonowej typu A. Materiały polimerowe, takie jak skaj i wykładzina PCV oraz mineralne (gips, zaprawa tynkarska) okazały się materiałami, na których *A. ochraceus* zachował zdolność wytwarzania ochratoksyny A, ale na niskim poziomie (rzędu 5-9 $\mu\text{g/kg}$). Na cemencie nie wykryto wzrostu pleśni, ani produkcji ochratoksyny A. Również niewielkie ilości tej toksyny (2,8-3,5 $\mu\text{g/kg}$) pleśń wytwarzały na płytach gipsowo-kartonowych z dodatkiem biocydu i silikonu. Stężenia ochratoksyny A były jednak 5-7 razy niższe niż na materiale bez tych substancji.

Ograniczona synteza ochratoksyny A na materiałach mineralnych wynikała ze słabego wzrostu *A. ochraceus* NRLL 3174 (Tabela 20). Na materiałach polimerowych pomimo dobrego wzrostu *A. ochraceus*, nie odnotowano jednak podwyższonej syntezy OTA. Natomiast na tapecie i skórze intensywny wzrost grzyba skorelowany był z wysoką produkcją OTA. Drewno, wykładzina dywanowa i płyta gipsowo-kartonowa okazały się materiałami korzystnymi do syntezy ochratoksyny A, pomimo słabszego, niż na skórze i tapecie, wzrostu grzyba.



Rys. 6. Produkcja ochratoksyny A przez *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 na materiałach budowlanych i wykończeniowych po 21 dniach hodowli

Podobne efekty zaobserwowano w przypadku szczepu *A. versicolor* 3, który rosnąc na drewnie, skórze i płycie gipsowo-kartonowej typu A bez dodatku biocydu, tworzył sterigmatocystynę w stężeniu powyżej 100 ng/ml, co w przeliczeniu na masę materiału wynosi 8,3-20 µg/kg materiału (Tabela 28).

Tabela 28. Produkcja sterigmatocystyny przez *Aspergillus versicolor* 3 na materiałach budowlanych i wykończeniowych po 21 dniach hodowli

Materiał budowlany/wykończeniowy	Sterigmatocystyna w materiale po hodowli <i>A. versicolor</i>
Cement	–
Gips	–
Zaprawa tynkarska	+
Drewno	+++
Tapeta	+
Wykładzina dywanowa	+
Wykładzina PCV	+
Skóra	+++
Skaj	+
Płyta gipsowo-kartonowa GKB typ A ¹	+++
Płyta gipsowo-kartonowa GKB typ H2 ²	–
Płyta gipsowo-kartonowa GKB typ DFH2 ³	–

– stężenie sterigmatocystyny < 20 ng; + stężenie sterigmatocystyny niskie (20-50 ng); ++ stężenie sterigmatocystyny średnie (50-100 ng); +++ stężenie sterigmatocystyny wysokie (>100 ng).

¹ GKB typ A: bez biocydu.

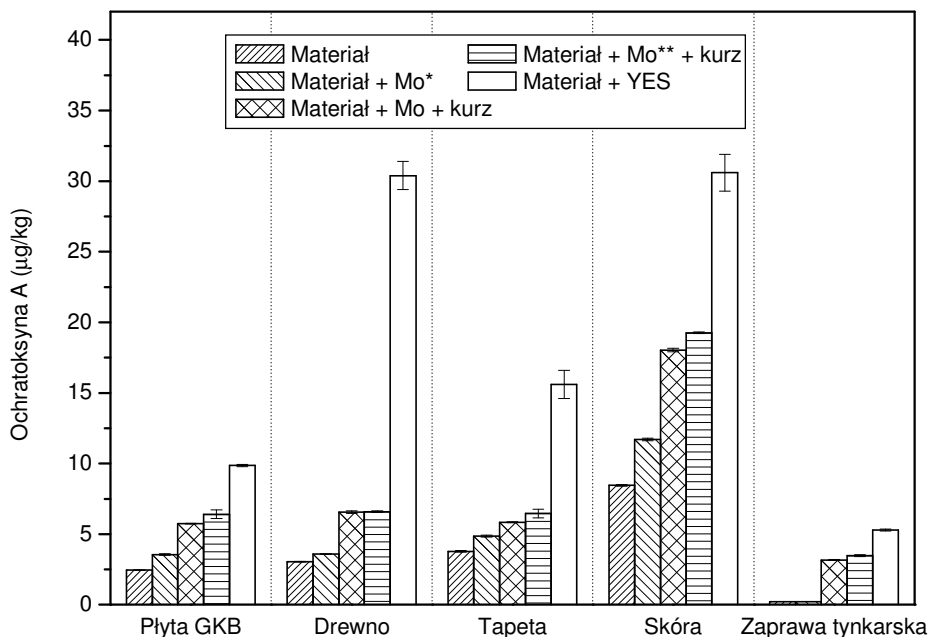
² GKBI typ H2: z dodatkiem biocydu oraz silikonu.

³ GKBI typ DFH2: zawiera silikon oraz biocyd, substancje przeciwoigniowe.

Niewielkie ilości sterigmatocystyny wykryto na tapecie, wykładzinie dywanowej, materiałach polimerowych i nieorganicznych. Natomiast nie obserwowano syntezy tej toksyny na cemencie, gipsie i płytach gipsowo-kartonowych z dodatkiem biocydu oraz biocydu i silikonu. Z reguły intensywny wzrost pleśni (Tabela 20) korelował z wysoką produkcją sterigmatocystyny. Jedynie na tapecie, pomimo iż stężenie ergosterolu było najwyższe, synteza sterigmatocystyny była nieznaczna.

Wpływ zanieczyszczeń w postaci kurzu domowego oraz związków nieorganicznych (pożywka Mo) i organicznych dodawanych wraz z pożywką (pożywka Mo z ekstraktem, pożywka YES) na tworzenie mikotoksyn przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych zbadano dla szczepu toksynotwórczego *A. ochraceus*

NRLL 3174. Stężenie wytworzonej ochratoksyny A po 21 dniowej hodowli pleśni określano metodą Elisa.



Rys. 7. Wpływ kurzu domowego oraz pożywek Mo i YES na tworzenie ochratoksyny A przez *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 na materiałach

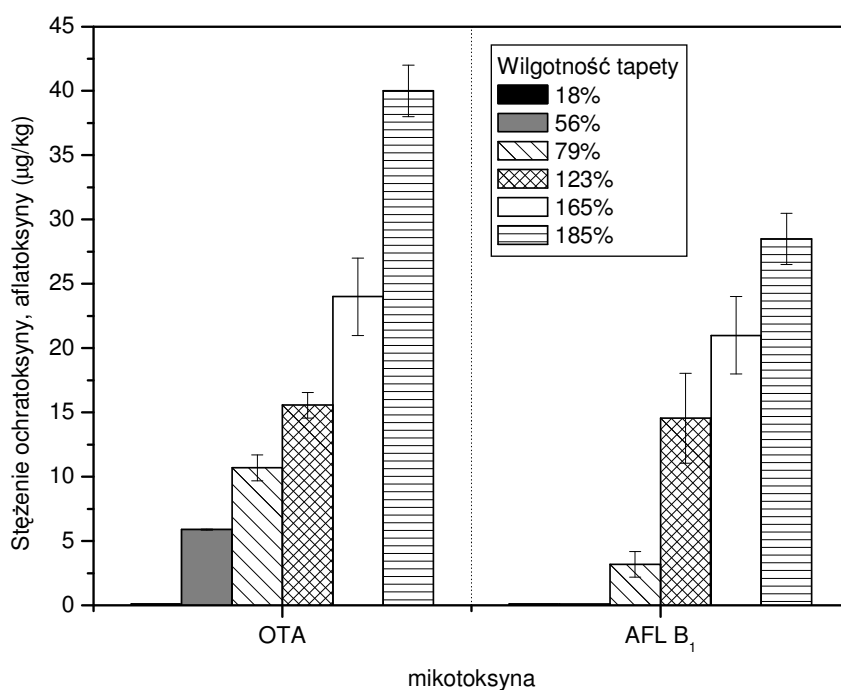
Skóra okazała się jedynym materiałem, na którym *A. ochraceus* NRLL 3174 wytwarzała ochratoksynę A w podwyższonych ilościach (8,5 µg/kg) (Rys. 7). Wynik ten korelował z aktywnym wzrostem *A. ochraceus* (Tabela 20). Na czystej płycie gipsowo-kartonowej, drewnie i tapecie szczep tworzył niewielkie ilości OTA (2,4-3,8 µg/kg), podczas gdy na czystej zaprawie nie wykryto tej mikotoksyny (próg czułości metody – 2 µg/kg).

Wprowadzenie na powierzchnię materiału, związków mineralnych (podłoże Mo) wpłynęło nieznacznie na zwiększenie produkcji OTA na wszystkich materiałach, z wyjątkiem zaprawy, na której nadal nie było warunków odpowiednich do wzrostu grzyba (Tabela 20).

Wykazano, że obecność kurzu domowego aktywowała wzrost pleśni i wytwarzanie OTA na wszystkich materiałach, w tym także na zaprawie tynkarskiej. Dodatek pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym spowodował, że grzyb w nieznacznym stopniu zintensyfikował produkcję toksyny – w porównaniu z efektem uzyskanym na materiale z podłożem Mo z dodatkiem kurzu. Dodatek do materiałów

pożywki YES aktywował rozwój pleśni i syntezę OTA. Najwyższe stężenie ochratoksyny A odnotowano na skórze i drewnie (30 µg/kg). W tych warunkach możliwa była również synteza OTA na zaprawie tynkarskiej.

Zbadano także, jak wpływa wilgotność masowa materiału w zakresie od 18 do 185% na produkcję ochratoksyny A przez *A. ochraceus* NRLL 3174 oraz aflatoksyny B₁ przez *A. flavus* KA 30 podczas hodowli na tapecie. Wybór szczepów i materiału wynikał ze zdefiniowanej we wcześniejszych badaniach, wysokiej toksynotwórczości i dobrego wzrostu tych szczepów na tym materiale. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 8.



Rys. 8. Wpływ wilgotności masowej tapety na produkcję mikotoksyn: OTA przez *Aspergillus ochraceus* NRLL 3174 oraz AFL B₁ przez *Aspergillus flavus* KA 30

Wykazano, iż badane szczepy nie rosły na tapecie o niskiej wilgotności masowej, wynoszącej 18% (Tabela 21) i nie produkowały mikotoksyn (Rys. 8). *A. ochraceus* NRLL 3174 syntezował ochratoksynę A na tapecie o wilgotności od 56%, a *A. flavus* KA 30 wymagał do wzrostu i produkcji aflatoksyny B₁ wilgotności co najmniej 79%.

Udowodniono, że synteza toksyn ulegała zwiększeniu wraz ze wzrostem wilgotności masowej tapety. Największą produkcję mikotoksyn odnotowano podczas wzrostu pleśni na tapecie o wilgotności 185%. W tych warunkach oznaczono stężenie 39,6 µg ochratoksyny A/kg i 28,5 µg aflatoksyny B₁/kg.

Podsumowanie

Zarówno materiały organiczne pochodzenia naturalnego, takie jak skóra, drewno, płyta gipsowo-kartonowa, tapeta papierowa, jak również materiał złożony z polimerów sztucznych i włókien naturalnych (wykładzina dywanowa), okazały się podłożem, na którym pleśnie produkowały mikotoksyny w wysokich stężeniach (OTA i sterigmatocystynę). Zdolność do produkcji mikotoksyn zaobserwowano także na sztucznych materiałach polimerowych, takich jak skaj, wykładzina PCV. Na tych materiałach produkcja toksyn była trzykrotnie niższa, niż na materiałach celulozowych i skórze. Najniższe stężenia mikotoksyn lub ich brak oznaczano na materiałach mineralnych – zaprawie, gipsie oraz cemencie. Wykazano również, iż dodatek do płyty gipsowo-kartonowej biocydu i związku hydrofobowego (silikonu) znacznie ogranicza (*A. ochraceus*) lub całkowicie eliminuje (*A. versicolor*) wzrost pleśni i produkcję mikotoksyn.

Udowodniono, że istotny wpływ na produkcję mikotoksyn przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych mają zanieczyszczenia organiczne. Stwierdzono, iż dodatek kurzu w stężeniu 0,01 g/próbkę materiału o powierzchni 16 cm² stymulował szczep *A. ochraceus* do wzrostu i produkcji ochratoksyny A. Szczególnie intensywną produkcję tej toksyny obserwowano, gdy na powierzchni materiałów budowlanych obecne były związki organiczne dostarczone z pożywką YES (sacharoza, ekstrakt drożdżowy). Obecność kurzu na powierzchniach materiałów budowlanych i wykończeniowych, szczególnie materiałów porowatych, takich jak drewno, tapety, materiały termoizolacyjne, ale również mineralnych, jest zjawiskiem powszechnym w mieszkaniach. Uzyskane wyniki pokazują, że wszelkie zanieczyszczenia bogate w przyswajalne składniki pokarmowe organiczne, stwarzają możliwość wzrostu pleśni i produkcji mikotoksyn. Wzrost stężenia związków organicznych na materiałach budowlanych powoduje zwiększenie ryzyka tworzenia znacznych ilości mikotoksyn – nawet na materiałach nieorganicznych, takich jak zaprawa tynkarska.

Istotny wpływ na produkcję mikotoksyn ma również wilgotność materiałów budowlanych. Na przykładzie tapety wykazano, że im wyższa jest wilgotność masowa materiału, tym wzrost grzybów i synteza mikotoksyn są intensywniejsze.

Wykazano, iż pomiędzy gatunkami pleśni występują różnice w wymaganiach dotyczących warunków niezbędnych do wzrostu i produkcji mikotoksyn. *A. flavus* wymagał do tworzenia aflatoksyny B₁ wyższej wilgotności masowej tapety

(79%) niż *A. ochraceus* (56%). Tapeta o wilgotności 18% nie sprzyjała rozwojowi grzybów i produkcji mikotoksyn.

4.2.7. Wpływ rodzaju materiału budowlanego na tworzenie białek alergennych

Badania modelowe, których wyniki są analizowane w tym rozdziale, miały na celu ocenę wpływu materiału budowlanego na rodzaj i ilość wytworzonych przez pleśnie białek, ze szczególnym uwzględnieniem białek o właściwościach alergennych. Pleśnie hodowano na tapecie, płycie gipsowo-kartonowej, gipsie, zaprawie tynkarskiej (z dodatkiem podłoża Mo z ekstraktem drożdżowym) oraz na podłożach kontrolnych MEA i Mo z ekstraktem drożdżowym. Po 21 dniach hodowli, z próbek materiałów budowlanych oraz pożywek porośniętych pleśniami ekstrahowano białka (p. 3.14) i rozdzielono je metodą elektroforezy SDS-PAGE (metodyka p. 3.15). Następnie oznaczano masy cząsteczkowe wykrytych białek (p. 3.15). Na ich podstawie sklasyfikowano potencjalne białka alergenne, wg International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee (IUISA). Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli 29.

Tabela 29. Białka tworzone przez pleśnie na materiałach budowlanych i podłożach mikrobiologicznych

Oznaczenia	Podłoża wzrostu					
	Płyta gipsowo-kartonowa	Tapeta	Gips	Zaprawa	MEA	Mo
<i>A. niger</i>						
Liczba wykrytych białek	20	6	13	7	12	4
Liczba specyficznych białek*	9	7	5	2	3	0
Masa cząsteczkowa wykrytych białek (kDa)	7-124	23-124	9-124	22-124	7-124	63-124
Liczba potencjalnych białek alergennych	2	1	1	0	1	0
Potencjalne białka alergenne, masa cząsteczkowa (kDa)**	Asp n 18 (34 kDa), Asp n 14 (105 kDa)	Asp n 14 (105 kDa)	Asp n 14 (105 kDa)		Asp n 14 (105 kDa)	

Tabela 29 (cd.)

<i>A. flavus</i>						
Liczba wykrytych białek	12	10	8	2	7	2
Liczba specyficznych białek *	6	4	0	0	2	1
Masa cząsteczkowa wykrytych białek (kDa)	16-106	16-221	16-104	32-48	16-104	32-44
Liczba potencjalnych białek alergennych	1	1	0	0	0	0
Potencjalne białka alergenne, masa cząsteczkowa (kDa)**	Asp fl 13 (34 kDa)	Asp fl 13 (34 kDa)				
<i>P. expansum</i>						
Liczba wykrytych białek	10	26	2	0	18	10
Liczba specyficznych białek*	5	12	1	0	6	4
Masa cząsteczkowa wykrytych białek (kDa)	16-74	17-116	46-70	–	16-109	17-52
Liczba potencjalnych białek alergennych	2	4	1	0	3	0
Potencjalne białka alergenne, masa cząsteczkowa (kDa)**	Pen ch 33 (16 kDa), Pen c 19 (70 kDa)	Pen c 13 (33 kDa), Pen c 32 (40 kDa), Pen c 22w (46 kDa), Pen c 19 (70 kDa)	Pen c 22w (46 kDa)		Pen c 13 (33 kDa), Pen c 32 (40 kDa), Pen c 22w (46 kDa)	
<i>P. chrysogenum</i>						
Liczba wykrytych białek	11	24	16	6	9	7
Liczba specyficznych białek *	6	15	7	5	4	5
Masa cząsteczkowa wykrytych białek (kDa)	20-82	21-118	30-113	51-118	51-82	61-97

Liczba potencjalnych białek alergennych	3	5	3	0	1	0
Potencjalne białka alergenne, masa cząsteczkowa (kDa)**	Pen ch 18 (32 kDa) Pen c 32 (40 kDa) Pen ch 20 (68kDa)	Pen c 13 (33 kDa), Pen ch 13 (34 kDa), Pen c 32 (40 kDa), Pen c 22w (46 kDa), Pen ch 20 (68 kDa)	Pen ch 18 (32 kDa) Pen ch 13 (34 kDa), Pen ch 20 (68 kDa)		Pen ch 20 (68k Da)	
<i>A. alternata</i>						
Liczba wykrytych białek	7	9	4	2	2	1
Liczba specyficznych białek*	2	4	4	2	0	0
Masa cząsteczkowa wykrytych białek (kDa)	30-114	12-118	22-130	30-60	12-30	30
Liczba potencjalnych białek alergennych	2	4	2	0	0	0
Potencjalne białka alergenne, masa cząsteczkowa (kDa)**	Alt a 1 (28 kDa), Alt a 10, (53 kDa)	Alt a 1 (28 kDa), Alt a 7 (22 kDa), Alt a 13 (26 kDa), Alt a 10 (53 kDa)	Alt a 7 (22 kDa), Alt a 13 (26 kDa)			
<i>C. cladosporioides</i>						
Liczba wykrytych białek	15	20	12	4	3	4
Liczba specyficznych białek*	2	7	1	0	3	3
Masa cząsteczkowa wykrytych białek (kDa)	9-97	9-222	9-97	12-110	29-72	40-135

Tabela 29 (cd.)

Liczba potencjalnych białek alergennych	4	4	3	1	0	0
Potencjalne białka alergenne, masa cząsteczkowa (kDa)**	Cla h 4 (11 kDa), Cla h 5 (22 kDa), Cla c 9 (36 kDa), Cla h 6 (46 kDa)	Cla h 4 (11 kDa), Cla h 5 (22 kDa), Cla c 9 (36 kDa), Cla h 6 (46 kDa)	Cla h 4 (11 kDa), Cla h 5 (22 kDa), Cla h 6 (46 kDa)	Cla h 4 (11 kDa)		

* białka specyficzne – wytwarzane tylko na poszczególnych podłożach.

** klasyfikowane wg International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee.

Największą różnorodność białek produkowały pleśnie: *Penicillium chrysogenum* (73 białka), *Aspergillus niger* (72 białka), *Penicillium expansum* (66 białek), *Cladosporium cladosporioides* (58 białek), a najmniejszą *Alternaria alternata* (25 białek) (Tabela 29). Wykazano, że rodzaj materiału budowlanego warunkuje zarówno ilość, jak i rodzaj wytwarzanych białek. Materiałem budowlanym, na którym pleśnie wytwarzały najwięcej różnych białek była tapeta (od 9 do 26, w zależności od gatunku pleśni) i płyta gipsowo-kartonowa (od 7 do 20). Na gipsie liczba wytworzonych białek była nieco niższa (od 2 do 16), natomiast na zaprawie tynkarskiej pleśnie tworzyły najmniej zróżnicowane białka (do 7).

Tapeta i płyta gipsowo-kartonowa były materiałami, na których pleśnie tworzyły największą ilość białek specyficznych tylko dla tego podłoża (odpowiednio na tapecie od 4 do 15 białek i na płycie gipsowo-kartonowej od 2 do 9 białek). Zaobserwowano, że większość szczepów (z wyjątkiem *P. expansum*) produkowała bardziej zróżnicowane białka na tapecie, płycie gipsowo-kartonowej oraz gipsie, niż na podłożach kontrolnych MEA oraz Mo.

Rosnąc na materiałach budowlanych, *A. niger* wytwarzał białka o masach cząsteczkowych od 7 do 124 kDa, *A. flavus* od 16 do 221 kDa, *P. expansum* od 16 do 116 kDa, *P. chrysogenum* od 20 do 118 kDa, *A. alternata* od 12 do 130 kDa, *C. cladosporioides* od 9 do 222 kDa. Na podłożach laboratoryjnych były to z reguły białka o niższych masach cząsteczkowych, z wyjątkiem produkowanych przez *A. niger*. Stwierdzono, iż na tapecie pleśnie wytwarzały białka o największej masie cząsteczkowej, od 116 do 222 kDa.

Sklasyfikowane przez IUISA białka potencjalnie alergenne najliczniej były wytwarzane na tapecie i płycie gipsowo-kartonowej. Na zaprawie tynkarskiej pleśnie nie produkowały białek alergennych, z wyjątkiem *C. cladosporioides* (białko Cla h 4). Największą zdolność produkcji białek alergennych na materiałach budowlanych wykazywały gatunki: *C. cladosporioides*, *P. chrysogenum*, *A. alternata*

oraz *P. expansum*. Najmniejszą liczbę białek alergennych wytwarzały pleśnie *A. niger* i *A. flavus*.

P. expansum, *P. chrysogenum* oraz *A. niger* tworzyły białka alergenne na podłożu MEA (liczba białek wynosiła odpowiednio: 3, 1, 1). Stwierdzono, że pleśnie produkowały więcej białek alergennych na materiałach budowlanych niż na podłożu kontrolnym MEA, na pożywce Mo pleśnie nie wytwarzały alergenów.

Do alergenów wytwarzanych przez pleśnie na materiałach budowlanych, które są opisane przez IUISA należały białka wytwarzane przez *P. chrysogenum*: Pen ch13, Pen ch18, Pen ch20, Pen c13, Pen c22w, Pen c32; *P. expansum*: Pen c13, Pen c19, Pen c22w, Pen c32, Pen ch33; *A. flavus*: Asp fl 13; *A. niger*: Asp n 14, Asp n 18; *A. alternata*: Alt a 1, Alt a7, Alt a 10, Alt a 13; *C. cladosporioides*: Cla h4, Cla h5, Cla h6, Cla c9.

W badaniach środowiskowych (p. 4.1.4) wskazano, iż wśród białek alergennych pleśni, reagujących z surowicami krwi mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń znaczna część białek nie była dotąd zidentyfikowana (16 białek z 39) (Tabela 30).

Tabela 30. Białka alergenne¹ wytwarzane przez pleśnie na materiałach budowlanych

Gatunek pleśni	Masa cząsteczkowa białka (kDa)	Rodzaj podłoża lub materiału budowlanego, na którym grzyb wytwarzał białko	Reakcja immunologiczna z surowicami mieszkańców*	Klasyfikacja białek**
<i>Penicillium chrysogenum</i>	89	tapeta	Surowica 1	nk
	85	tapeta	Surowica 3	nk
	68	tapeta, płyta g-k, gips, MEA	Surowica 4	Pen ch 20
	46	tapeta	Surowica 4	Pen c 22w
	43	tapeta, płyta g-k	Surowica 1	nk
	40	tapeta, płyta g-k	Surowica 2	Pen c 32
	34	tapeta, gips	Surowica 1, 2	Pen ch 13
	33	Tapeta	Surowica 2	Pen c 13
	32	płyta g-k, gips	Surowica 2	Pen ch 18
	27	tapeta, płyta g-k	Surowica 1,2	nk
	24	tapeta, płyta g-k	Surowica 3	nk
	21	tapeta	Surowica 2	nk
<i>Penicillium expansum</i>	93	tapeta	Surowica 4	nk
	88	tapeta	Surowica 1, 2, 3, 4	nk
	79	tapeta	Surowica 3	nk
	70	tapeta, płyta g-k	Surowica 1, 2, 4	Pen c 19

Tabela 30 (cd.)

<i>Penicillium expansum</i>	64	tapeta	Surowica 3	nk
	53	tapeta	Surowica 3	nk
	46	tapeta, gips, MEA	Surowica 3	Pen c 22w
	40	tapeta, MEA	Surowica 3	Pen c 32
	33	tapeta, MEA	Surowica 3	Pen c 13
	16	plyta g-k	Surowica 3	Pen ch 33
<i>Aspergillus flavus</i>	71	tapeta	Surowica 1	nk
	34	tapeta, plyta g-k	Surowica 4	Asp fl 13
<i>Aspergillus niger</i>	105	tapeta, plyta g-k, gips, MEA	Surowica 1, 2	Asp n 14
	34	plyta g-k	Surowica 1	Asp n 18
<i>Alternaria alternata</i>	64	plyta g-k	Surowica 1, 3	nk
	53	tapeta, plyta g-k	Surowica 1, 2, 3, 4	Alt a 10
	28	tapeta, plyta g-k	Surowica 1, 2, 3, 4	Alt a 1
	26	tapeta, gips	Surowica 3	Alt a 13
	22	tapeta, gips	Surowica 3	Alt a 7
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	53	tapeta, plyta g-k	Surowica 1	nk
	48	tapeta, gips	Surowica 3, 4	nk
	46	tapeta, plyta g-k, gips	Surowica 2, 3	Cla h 6
	36	tapeta, plyta g-k	Surowica 1, 2	Cla c 9
	22	tapeta, plyta g-k, gips	Surowica 2	Cla h 5
	11	tapeta, plyta g-k, gips, zaprawa	Surowica 2	Cla h 4

¹ reagujące z surowicami krwi mieszkańców zagrzybionych mieszkań.

plyta g-k – plyta gipsowo-kartonowa.

nk – niesklasyfikowane.

*reakcja z surowicami krwi mieszkańców nr 1, 2, 3, 4.

**wg International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee.

Kolorem szarym zaznaczono antygeny, które reagowały z więcej niż jedną surowicą krwi mieszkańców.

Wykazano, że gatunki *P. chrysogenum* oraz *P. expansum* syntetyzują w środowisku budowlanym najwięcej białek alergennych (12 i 10). Masy cząsteczkowe białek produkowanych przez *P. chrysogenum* wynosiły od 21 do 89 kDa, a białek *P. expansum* od 16 do 93 kDa. Najmniej białek alergennych wytwarzały pleśnie *A. flavus* (dwa białka o masach 34 i 71kDa) oraz *A. niger* (dwa białka o masach 34 i 105kDa).

Alergenami najczęściej reagującymi z surowicami krwi mieszkańców (częstość reakcji N = 4/4 badania) były białka produkowane przez *P. expansum* (Mcz 88 kDa), *A. alternata*, (Mcz 28 kDa, Alt a 1), *A. alternata* (Mcz 53 kDa, Alt a 10). Rzadziej reakcję alergenną wywoływały białka *P. chrysogenum*, *A. niger*, *C. cladosporioides*. Reakcje immunologiczne zachodziły przede wszystkim między surowicami krwi a alergenami, które tworzone były na tapecie, płycie gipsowo-kartonowej, gipsie i sporadycznie na podłożu MEA i zaprawie tynkarskiej. Na podłożu Mo pleśnie nie tworzyły alergenów reagujących z surowicami krwi mieszkańców.

Materiały budowlane okazały się zatem środowiskiem bardziej sprzyjającym wytwarzaniu alergenów przez grzyby strzępkowe, niż podłoża mikrobiologiczne (MEA, Mo).

Podsumowanie

Rodzaj materiału budowlanego kształtuje profil wytworzonych przez pleśnie białek alergennych. Najwięcej białek alergennych pleśnie tworzyły na tapecie i płycie gipsowo-kartonowej, zachowały również zdolność do ich produkcji na gipsie. Natomiast zaprawa tynkarska nie jest środowiskiem korzystnym, ani dla wzrostu pleśni, jak i produkcji alergenów. Wykazano przy tym, iż na tapecie grzyby produkowały białka o wyższej masie cząsteczkowej niż na płycie kartonowej, gipsie i zaprawie tynkarskiej.

Szczepy *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata* i *Cladosporium cladosporioides* wytwarzały najwięcej alergenów podczas hodowli na materiałach budowlanych. Zarejestrowano łącznie produkcję 39 alergenów, w tym 23 białka opisane i sklasyfikowane przez IUISA. Najczęściej reakcję uczuleniową u mieszkańców zagrzybionych budynków powodowały cztery białka wytwarzane przez gatunki: *P.expansum* (Mcz 88 kDa), (Mcz 70 kDa, Pen c 19); *A. alternata*, (Mcz 28 kDa, Alt a 1), (Mcz 53 kDa, Alt a 10), rosnące na płytach kartonowo-gipsowych oraz na tapecie.

Grzyby strzępkowe wytwarzały białka alergenne podczas wzrostu na materiałach budowlanych w znacznie większych ilościach, niż na pożywce mikrobiologicznej MEA. Na pożywce Mo pleśnie nie produkowały alergenów. Białka alergenne wytwarzane przez pleśnie na materiałach budowlanych mogą być wykorzystane w badaniach laboratoryjnych jako markery diagnostyczne przydatne do stwierdzenia reakcji uczuleniowych na alergeny obecne w pomieszczeniach mieszkalnych. Ułatwi to i zwiększy szansę wykrycia alergii na pleśnie u osób zamieszkujących zagrzybione budynki.

5. Dyskusja wyników

Na ryzyko rozwoju grzybów strzępkowych w budynkach mieszkalnych zwracano wielokrotnie uwagę, również w Polsce. Podkreślano wzrost liczby zagrzybionych pomieszczeń mieszkalnych, w tym także w nowoczesnym budownictwie (Zyska, 1999; Rymśa, 2003). Sugerowano również możliwość tworzenia związków toksycznych przez grzyby strzępkowe izolowane z budynków (Piontek, 2004; Grajewski, 2006) oraz wskazywano na zależność między obecnością pleśni toksynotwórczych w pomieszczeniach mieszkalnych a zwiększoną zachorowalnością na niektóre choroby (Aleksandrowicz i Smyk, 1973; Doleżał, 1992).

Powszechny rozwój grzybów strzępkowych w mieszkaniach jest niewątpliwie wynikiem nie tylko braku wiedzy z zakresu techniki, ale również mikologii budowlanej. Badania mikologiczne prowadzone przez Polskie Stowarzyszenie Mikologów Budownictwa koncentrują się głównie na analizie czynników fizycznych, które mogą być przyczyną rozwoju grzybów na przegrodach budowlanych oraz poszukiwaniu skutecznych metod usuwania grzybów strzępkowych. Przyjęto uproszczoną procedurę oceny mikologicznej mieszkań, posługując się ogólną charakterystyką grzybów strzępkowych i ich oddziaływań na organizm ludzki. Zagrożenia zdrowotne, powodowane przez działanie cytotoksyczne, genotoksyczne oraz alergenne różnych produktów metabolizmu pleśni nie były dotąd potwierdzane w warunkach hodowli grzybów strzępkowych na materiałach budowlanych i wykończeniowych, stosowanych w polskim budownictwie.

Podjęte w tej pracy badania miały na celu wskazanie, jakie materiały budowlane i wykończeniowe są najczęściej zasiedlane przez grzyby strzępkowe oraz jakie stanowią zagrożenia zdrowotne. Celem badań laboratoryjnych prowadzonych z wykorzystaniem szczepów pleśni wyizolowanych z mieszkań było wyjaśnienie, jak wpływa określony materiał budowlany na toksynotwórczość, cyto- i genotoksyczność oraz alergenność pleśni oraz jakie warunki obecności substancji odżywczych i wilgotności są korzystne dla wzrostu tych mikroorganizmów oraz syntezy mikotoksyn.

Realizacja celu wymagała prowadzenia badań dwuetapowo: pierwszy obejmował ocenę zagrzybienia pomieszczeń w budynkach mieszkalnych oraz badania toksykologiczne i ocenę zdrowia mieszkańców. Natomiast drugi etap (badania laboratoryjne, przeprowadzone na materiałach budowlanych), zmierzał do oceny wzrostu, toksynotwórczości, cyto- i genotoksyczności oraz alergenności pleśni wyizolowanych z zagrzybionych budynków.

Badania prowadzone w budynkach mieszkalnych w regionie łódzkim wykazały, iż główną przyczyną rozwoju pleśni była wysoka wilgotność względna powietrza WWP > 60%, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi wskazującymi, iż wilgotność jest kluczowym czynnikiem dla aktywacji i rozwoju pleśni w środowisku budowlanym (Zyska, 1999; Flannigan i in., 2001a; Rymśza, 2003). Nadmierna wilgotność powietrza w pomieszczeniach mieszkalnych była wynikiem braku wentylacji, zastosowania nowej szczelnej stolarki okiennej oraz obniżonej temperatury pomieszczeń. Na te czynniki wskazywali już autorzy innych badań (Zyska, 1999; Janińska, 2000; 2001). Dodatkowo wysokiej wilgotności powietrza sprzyjało ogrzewanie mieszkań, a w starych kamienicach – grzejnikiem naftowym bądź piecem węglowym.

Analiza mikologiczna przeprowadzona metodą hodowlaną i chemiczną (oznaczanie ergosterolu), potwierdziła wysokie zanieczyszczenie pleśniami przegród budowlanych i powietrza w pomieszczeniach z objawami zagrzybienia. Liczba pleśni na przegrodach budowlanych wynosiła średnio $7,8 \times 10^7$ jtk/100 cm² i $3,1 \times 10^3$ jtk/m³. Stężenie ergosterolu wynosiło odpowiednio 12,2 µg/100 cm² oraz w powietrzu 2,6 µg/m³. Uzyskane wyniki były porównywalne bądź wyższe od tych, które otrzymano badając budynki zagrzybione w innych krajach oraz w innych rejonach Polski (rejon zielonogórski oraz wielkopolski) (Hunter i in., 1988; Miller i in., 1988; Doleżał, 1992; Rymśza, 2003; Piontek, 2004.). W łódzkich budynkach mieszkalnych izolowano najczęściej gatunki należące do rodzajów *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Trichoderma*. Te same gatunki grzybów były również izolowane przez innych autorów (Flannigan, 2001a; Singh, 2001; Zyska, 2001a; Piontek, 2004). Wykazano ponadto, iż w budynkach zagrzybych jest większa różnorodność pleśni i częściej występują grzyby z rodzaju *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*), w porównaniu z budynkami bez objawów zagrzybienia. Dodatkowo, w budynkach zagrzybych izolowano pleśnie z rodzajów *Stachybotrys*, *Ulocladium*, *Paecilomyces*, należące do organizmów chorobotwórczych. Wysoka wilgotność powietrza w budynkach zagrzybych sprzyjała ich rozwojowi.

Potwierdzono ponadto zależność między występowaniem określonych gatunków pleśni a poziomem wilgotności względnej powietrza w pomieszczeniach. Na prawidłowość tę zwrócił uwagę Grant i wsp. (1989), dzieląc grzyby strzępkowe na kolonizatorów pierwotnych i wtórnych, w zależności od preferowanej wilgotności (autor brał pod uwagę wartości aktywności wody a_w na papierze powleczonym farbą emulsyjną). Prezentowane wyniki badań dotyczące rozwoju pleśni na powierzchni tynku, powłoki malarskiej, tapety, płyty gipsowo-kartonowej pokrytej powłoką emulsyjną, drewna, częściowo tylko pokrywają się z wnioskami Granta. Autor ten zaliczył bowiem *Aspergillus versicolor* do gatunków kserofilnych,

pierwotnych kolonizatorów (WWP < 80%). W obecnych badaniach grzyb okazał się gatunkiem występującym głównie w mieszkaniach wysoce zawilgoconych, w których wilgotność względna powietrza przekraczała 80%. Ta rozbieżność wyników dowodzi, że mamy do czynienia ze szczepami o różnej zdolności adaptacji do warunków środowiska, pomimo, że należą do tego samego gatunku. Wyniki zgodne z propozycjami Granta uzyskano dla gatunków *Cladosporium macrocarpum*, *Ulocladium chartarum* oraz *Stachybotrys chartarum* (grzyby zaliczone do kolonizatorów wtórnych, występujące w pomieszczeniach, gdzie WWP > 80%).

Stopień zanieczyszczenia grzybami przegród budowlanych oraz powietrza oceniamy zwykle metodą hodowlaną; badania takie trwają długo i nie uwzględniają obecności nieaktywnych, niezdolnych do wzrostu form morfologicznych grzybní. Metodą, która pozwala na szybką odpowiedź na pytanie o stopień zanieczyszczenia materiałów pleśniami oraz dokładną ocenę ilościową jest oznaczanie ergosterolu. Ergosterol jest dobrym wskaźnikiem całkowitej ilości pleśni w środowisku, zarówno form morfologicznych żywych, jak i nieaktywnych, niezdolnych do wzrostu (Gutarowska, 1999).

W literaturze znajduje się wiele przykładów wykorzystania ergosterolu jako wskaźnika zanieczyszczenia grzybami budynków (Miller i in., 1988; Pasanen i in., 1999; Nielsen i Madsen, 2000; Gutarowska i Żakowska, 2002; Hippelein i Rügamer, 2004). Podawane są graniczne wartości stężeń ergosterolu wskazujące na aktywny rozwój grzybów na materiałach budowlanych (Gutarowska i Żakowska, 2002), natomiast do tej pory nie określono limitów zawartości ergosterolu w powietrzu budynków mieszkalnych, wskazujących na nadmierne zanieczyszczenie grzybami. W prezentowanej pracy zaobserwowano istotną różnicę między stężeniem ergosterolu w powietrzu pomieszczeń zagrzybionych i kontrolnych. W pomieszczeniach zagrzybionych zawartość ergosterolu zawsze przekraczała 2 µg/m³ powietrza, natomiast w pomieszczeniach bez oznak zagrzybienia zawartość ergosterolu była dziesięciokrotnie niższa. Ponadto w pomieszczeniach bez aktywnego rozwoju pleśni, nie odnotowano objawów chorobowych u mieszkańców, natomiast zwiększoną ich częstość w pomieszczeniach zagrzybionych. Na uwagę zasługuje również fakt, iż zarówno formy zdolne, jak i niezdolne do wzrostu, wykrywane tylko z użyciem pomiaru ergosterolu, wykazują biologiczną aktywność wobec organizmów żywych (Baran, 1998). Wobec niskiej wykrywalności grzybów metodą hodowlaną (Górny i in., 2002) oraz wykazanej w tej pracy dodatniej korelacji między stężeniem ergosterolu i częstością występowania objawów chorobowych u mieszkańców, można wskazać wartość 0,2 µg ergosterolu/m³ powietrza jako poziom dopuszczalny zanieczyszczenia powietrza grzybami strzępkowymi.

W zagrzybionych budynkach obserwowano znacznie częstsze, niż w budynkach bez oznak zagrzybienia, objawy chorobowe mieszkańców, głównie alergii, ale także SBS. Ludzie często uskarżali się na duszność, katar, kaszel, łzawienia, wykwity skórne, nieżyt błon śluzowych nosa i gardła (częstość poszczególnych objawów wynosiła od 30% do 65%).

U 40% mieszkańców zagrzybionych budynków ujawniono podwyższony poziom przeciwciał IgE w surowicy krwi, a u 10% zdiagnozowano alergię na pleśnie potwierdzoną testami skórnymi oraz oznaczaniem obecności w surowicy krwi swoistych przeciwciał przeciwko pleśniom (asIgE). W literaturze opisuje się, iż alergia na pleśnie dotyczy 5% populacji, w tym występuje u 10-50% pacjentów atopowych (atopia – genetycznie uwarunkowana predyspozycja do wytwarzania przeciwciał klasy IgE, najważniejsze choroby atopowe – atopowe zapalenie skóry, alergiczny nieżyt nosa i astma) (Kurup i in., 2002; Gioulekas i in., 2004; Bush i in., 2006).

W prezentowanej pracy wykazano w surowicy krwi mieszkańców zagrzybionych budynków obecność specyficznych przeciwciał (asIgE) skierowanych przeciw antygenom takich gatunków grzybów, jak: *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuis*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* oraz mieszaninom alergenów *Aspergillus mix.*, *Penicillium mix.*, *Cladosporium mix.* Doleżal (1992) wskazała, że w surowicy krwi mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń są obecne przeciwciała skierowane przeciw grzybom: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium meleagrimum*, *Cladosporium herbarum*. Lander i wsp. (2001) wykryli w surowicy krwi specyficzne przeciwciała asIgE przeciwko *Aspergillus sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Stachybotrys chartarum*.

W diagnostyce alergii na pleśnie stosuje się najczęściej, obok wywiadu, oznaczanie ogólnego poziomu przeciwciał IgE w surowicy krwi, testy skórne (SPT) oraz oznaczanie swoistych przeciwciał asIgE (alergen – specific IgE – specyficzne przeciwciała) (Bogacka, 2008).

Według Bush i wsp. (2006) wykrywanie przeciwciał asIgE jest najbardziej miarodajne w ocenie wrażliwości immunologicznej na pleśnie. Z kolei Bogacka (2008) wykazuje, że w praktyce diagnostycznej obserwuje się znacznie częściej korelację między wywiadem i testami skórnymi, niż stężeniem asIgE. Uważa się, że wyniki testów skórných mogą być wątpliwe, ze względu na niestandardyzowane stężenia alergenów, stosowanie mieszaniny alergenów, opóźnioną reakcję immunologiczną lub jej brak u niektórych pacjentów (mimo występowania uczulenia) oraz stosowanie ograniczonych zestawów alergenów w rutynowych analizach (D'Amato i in., 1997; Mari i in., 2003; Niedożytko i in., 2004). Podwyższony poziom przeciwciał IgE w surowicy (powyżej 100 KU/l) może jedynie potwierdzać wykrytą innymi metodami alergię. W prezentowanej pracy,

u jednej osoby stwierdzono objawy alergii i obecność specyficznych przeciwciał asIgE w surowicy krwi, mimo iż ogólny poziom przeciwciał z klasy IgE był niski (16 KU/l).

Najpełniejszą informację o tym, na jakie antygeny uczulony jest pacjent – można uzyskać, stosując technikę immunoblottingu (VanRee i in., 2006). Metoda ta polega na izolacji i rozdzieleniu elektroforetycznym antygenów gatunków pleśni występujących w otoczeniu osoby uczulonej, a następnie reakcji immunologicznej z surowicą pacjenta. Można zatem wykryć, na jaki antygen uczulony jest pacjent. Jednak w praktyce diagnostycznej metoda ta jest stosowana rzadko; raczej wykorzystywana jest do celów naukowych.

Metodę immunoblottingu wykorzystywano w niniejszej pracy. Badania surowicy krwi mieszkańców, wykonane tą metodą, wykazały uczulenie na wiele antygenów pleśni obecnych w mieszkaniach. Wśród nich dominowała alergia na grzyby z rodzajów *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. expansum*) oraz *Alternaria alternata* i *Cladosporium cladosporioides*. Jeden z mieszkańców był uczulony dodatkowo na alergeny *Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger*. Możliwość wywoływania alergii przez wymienione pleśnie była opisywana w literaturze (Flannigan i in., 1991; Kurup i in., 2000; 2002; Sanchez i Bush, 2001; Vijay i in., 2005). Dzięki zastosowaniu metody immunoblottingu w badaniach prezentowanych w niniejszej pracy oraz równoległego rozdzielenia elektroforetycznego wyodrębnionych białek metodą SDS-PAGE, oznaczono masy cząsteczkowe białek alergennych, które reagowały z przeciwciałami obecnymi w surowicach mieszkańców zagrzybionych budynków. Wykazano, iż technika immunoblottingu jest najbardziej czuła spośród badanych i umożliwia wykrycie poszczególnych białek alergennych wytwarzanych przez pleśnie, na które są uczuleni mieszkańcy zagrzybionych budynków. Również Vojdani (2004) rekomenduje stosowanie tej metody w precyzyjnej diagnostyce uczuleń na pleśnie.

Większość wykrytych w aktualnie prezentowanych badaniach białek alergennych (22/39 badanych) jest sklasyfikowana przez International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee. Wśród białek alergennych *A. alternata* o masach cząsteczkowych od 22 kDa do 64 kDa są białka sklasyfikowane jako alergeny Alt a 1, Alt a 7, Alt a 10, Alt a 13. Najczęściej reakcje uczuleniowe na pleśnie dotyczą alergenu Alt a1 (Mcz 28 kDa), u 80% osób uczulonych występuje reakcja immunologiczna surowicy krwi z tym alergenem (Kurup i Banerjee, 2000). Jest to białko obecne w grzybnii i zarodnikach w przestrzeni okołoplazmatycznej, składające się z dwóch podjednostek (Bretenbach i in., 2002). Reakcje uczuleniowe na alergeny Alt a 7 (Mcz 22 kDa) i Alt a10 (Mcz 53 kDa) dotyczą odpowiednio 7% i 2% osób atopowych. Białka te są sklasyfikowane i oznaczane jako białko YCP4 (Alt a 7)

i dehydrogenaza aldehydowa (Alt a 10), która jest znanym enzymem katalizującym utlenienie aldehydów. Alergen Alt a 13 (Mcz 26) jest enzymem S-transferazą glutationową (Jahnz-Różyk, 2008). Wśród wymienionych alergenów często zachodzą reakcje krzyżowe z innymi białkami, np. białko Alt a 7 (YCP4) reaguje z białkiem YCP 4 *S.cerevisiae* oraz Cla h 6 *C.herbarum* (enolaza), a białko Alt a 10 reaguje z białkiem rybosomalnym P2 *A.alternata* (Alt a 6) oraz YCP4 *S. cerevisiae* (Kurup i Banerjee, 2000, Bretenbach i in., 2002).

Wśród białek *Cladosporium cladosporioides* (Mcz od 11 do 53 kDa), które reagowały z badanymi surowicami, występowały cztery sklasyfikowane alergeny: Cla h 4, Cla h 5, Cla h 6, Cla c 9. Białko Cla h 6 (enolaza, Mcz 46) jest enzymem z klasy liasz, katalizującym przedostatnią reakcję w glikolizie – przekształcenie fosfoglicerynianu do fosfoenolopirogronianu. U 43% osób atopowych białko to wywołuje reakcję alergenną. Licznie występują reakcje krzyżowe tego białka z innymi, np. enolazami *A. alternata*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*. Alergeny Cla h 4 (kwaśne białko rybosomalne P2, Mcz 11 kDa) i Cla h 5 (białko YCP 4, Mcz 22 kDa) wywołują reakcje uczuleniowe u 22% osób. Również często obserwuje się ich reakcje krzyżowe z innymi alergenami (Cla h 4 z alergenem P2 *A. alternata* (Alt a 6), P2 *A. flavus* i Asp f 8 *A. fumigatus*; Cla h 5 z YCP 4 *A. alternata* Alt a 7 oraz z YCP4 *S.cerevisiae*) (Kurup i Banerjee, 2000; Bretenbach i in., 2002). Białko alergenne o masie cząsteczkowej 36 kDa sklasyfikowane jako Cla c 9 nie jest jeszcze zbadane.

Według danych literaturowych, do najbardziej reaktywnych immunologicznie antygenów wytwarzanych przez pleśnie z rodzaju *Penicillium* należą białka: *P. oxalicum* 30 kDa i 34 kDa oraz 32 kDa (Pen ch 18), *P.chrysogenum* 35 kDa (Pen ch 13) oraz *P. citrinum* 34 kDa (Penc c 24) (Su i in., 1999; Shen in., 2003; Tang i in., 2005). Alergenność białek wytwarzanych przez szczepy z rodzaju *Penicillium* potwierdzono w testach z surowicami mieszkańców zagrzybionych budynków. Ponadto oznaczono jeszcze inne sklasyfikowane białka alergenne wytwarzane przez obydwa badane gatunki z rodzaju *Penicillium* Pen c 13 (33 kDa), Pen c 32 (40 kDa) oraz alergeny wytwarzane przez *P. chrysogenum*: Pen c 22w (46 kDa), Pen ch 20 (68 kDa) i *P. expansum* Pen c 19 (70 kDa), Pen c 22w (46 kDa), Pen ch 33 (16 kDa). Białka alergenne wytwarzane przez szczepy *Penicillium* należą głównie do enzymów katalizujących podstawowe reakcje komórkowe, np. enolaza (Pen c 22w), bądź reakcje rozkładu białek obecnych w środowisku, np. należące do grupy hydrolaz – alkaliczna proteaza serynowa (Pen c 13; Pen ch 13) i wakuolarna proteaza serynowa (Pen ch 18) oraz polisacharydów – N-acetyloglukozaminidaza (Pen ch 20) – enzym rozkładający polisacharydy.

Wyniki ostatnich badań wskazują, iż niektóre białka mogą pełnić jeszcze wiele innych funkcji niekatalitycznych. Na przykład enolaza na powierzchni komórek może stanowić receptor dla pewnych ligandów, np. plazminogenu ludzkiego, co między innymi ułatwia inwazyjność patogenów, również pełni funkcje immunologicznego modulatora, obecność enolazy na komórkach drobno-ustrojów patogennych może wzbudzić rozwój chorób autoimmunologicznych (Seweryn i in., 2007).

Są wśród nich również białka pełniące istotne funkcje w komórce, np. białko szoku cieplnego P70 (Pen c 19), regulujące fałdowanie białka *de novo* po szoku termicznym, zapobiegające agregacji w wysokiej temperaturze, występuje głównie w zarodnikach pleśni. Białko Pen c 32 wykazuje podobieństwo do liazy pektynowej, natomiast funkcja białka Pen ch 33 nie jest do końca poznana. Wymienione białka – ze względu na podobieństwo budowy – często dają reakcje krzyżowe z alergenami innych gatunków pleśni z rodzaju *Penicillium*, np. *P. brevicompactum*, *P. oxalicum* (Kurup i Banerjee, 2000; Bretenbach i in., 2002).

W reakcjach z surowicami krwi mieszkańców zagrzybionych budynków wykryto trzy sklasyfikowane alergeny pleśni z rodzaju *Aspergillus*: Asp n 14 (Mcz 105 kDa), Asp n 18 (Mcz 34 kDa) oraz Asp fl 13 (Mcz 34 kDa). Są to znane enzymy: egzo- β -1,4-D-ksylozydaza (enzym rozkładający obecny w drewnie ksylan do oligosacharydów), wakuolarna proteaza serynowa oraz alkaliczna proteaza serynowa. Również wśród tych białek obserwuje się reakcje krzyżowe z alergenami *Aspergillus oryzae*, *A. flavus* oraz *Penicillium chrysogenum* *P. citrinum* (Kurup i Banerjee, 2000; Bretenbach i in., 2002).

Wymienione, sklasyfikowane alergeny są obecne zarówno w grzybni, jak i zarodnikach pleśni. Niektóre z nich to białka sekrecyjne wydzielane do środowiska. Znana jest sekwencja DNA kodująca te białka (Kurup i Banerjee, 2000; International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee). Oprócz tych białek, w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy wykryto jeszcze 17 innych białek uczestniczących w reakcjach z surowicami krwi mieszkańców, które nie były dotąd opisywane w literaturze. Na uwagę zasługują białka *P. expansum* o masach cząsteczkowych 70 kDa i 88 kDa, które reagowały z surowicami wszystkich badanych mieszkańców.

Badania objawów SBS potwierdziły również częstsze (średnio o 15-20%) ich występowanie u mieszkańców zagrzybionych budynków niż w mieszkaniach kontrolnych. Ludzie uskarżali się na bóle głowy, zaburzenia snu, osłabienie, zmęczenie i inne objawy, które ustępowały po opuszczeniu na dłużej zamieszkałych budynków. W literaturze wskazuje się, że czynnikami aktywnymi biologicznie, produkowanymi przez grzyby są (1 \rightarrow 3) - β -glukan oraz związki lotne MVOCs (Rylander i Lin, 2000; Singh, 2001; Behrendt i Lemnen, 2002). Być może –

również mikotoksyny wytwarzane na przegrodach budowlanych w niskich ilościach, lecz oddziałujące na mieszkańców przez wiele lat (proces zagrzybienia trwał od 4 do 15 lat) mogą indukować objawy SBS. Występowanie SBS u osób przebywających w budynkach porażonych przez grzyby może być wynikiem obecności mikotoksyn w powietrzu. Wykazywano, że w mieszkaniach, w których obecne były pleśnie *Stachybotrys chartarum* lub *Aspergillus versicolor*, mieszkańcy cierpieli na objawy takie, jak kaszel, podrażnienie błon śluzowych oczu, skóry, dróg oddechowych, wykwity skórne, bóle głowy, stawów, zmęczenie, podrażnienie, osłabienie odpowiedzi immunologicznej i częstą zapadalność na choroby (Jarvis i in., 1998; Hodgson i in., 1998; Tuomi i in., 2000). Mikotoksyny wytwarzane przez te pleśnie były wykrywane w płucach i surowicy krwi mieszkańców.

W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy nie wykryto w budynkach mieszkalnych mikotoksyn oraz nie stwierdzono cytotoksyczności i genotoksyczności zagrzybionych przegród budowlanych. Obserwowano jednak zły stan zdrowia mieszkańców zagrzybionych budynków, w tym liczne objawy SBS. Powstało zatem pytanie, czy na materiałach budowlanych, na których rozwijały się pleśnie tworzone są mikotoksyny i czy oddziałują cyto- i genotoksycznie. Odpowiedź przyniosły wyniki doświadczeń laboratoryjnych, w których badano wzrost pleśni na materiałach budowlanych, obecność w nich mikotoksyn, a ponadto cytotoksyczność, genotoksyczność oraz powstanie alergenów.

Badania wykonane na 103 próbach materiałów budowlanych konstrukcyjnych, wykończeniowych oraz termoizolacyjnych, pobranych z zagrzybionych budynków wykazały, iż grzyby strzępkowe są zdolne do wzrostu na większości badanych materiałów. Jedynie cement okazał się materiałem niesprzyjającym rozwojowi pleśni, co potwierdziły zarówno badania środowiskowe, jak i laboratoryjne.

Najintensywniejszy wzrost, określony w oparciu o zawartość ergosterolu, jak również najszybszą jego syntezę, stwierdzono na tapecie papierowej, skórze tapicerskiej, drewnie i płytach gipsowo-kartonowych. Materiały te sprzyjały aktywnemu rozwojowi pleśni, co wynikało z dostępności substancji organicznych, głównie celulozy i keratyny. Wzrost pleśni na materiałach pochodzenia celulozowego: tapecie, płytach gipsowo-kartonowych oraz na skórze był już wcześniej odnotowany przez Nielsena i in. (1999; 2004), Seiferta i Frisvada (2000), Falkiewicz-Dulik (2005). Zdolność do wykorzystywania (jako źródła węgla i azotu) organicznych materiałów budowlanych pochodzenia naturalnego, zawierających celulozę lub keratynę, wynika z produkcji przez pleśnie zewnątrzkomórkowych enzymów celulolitycznych i proteolitycznych (Nikulin i in., 1994; Gutarowska, 2010).

Wyniki badań opisanych w niniejszej pracy wskazały, że aktywny wzrost pleśni w budynkach oraz potwierdzony w badaniach laboratoryjnych miał miejsce również na materiałach polimerowych (wykładzina dywanowa, skaj, wykładzina

PCV). W badaniach innych autorów obserwowano wzrost pleśni na piankach poliuretanowych, wełnie mineralnej oraz PCV (Ezeonu i in., 1994; Webb i in., 2000; Zyska i Żakowska, 2005). Jak wykazano w niniejszej pracy wzrost pleśni na tych materiałach jest jednak możliwy dopiero w warunkach wysokiej wilgotności powietrza, przy dostępie materii organicznej (np. w postaci pożywki Mo z ekstraktem drożdżowym, pożywki YES lub pożywki Mo z kurzem domowym). Niewielki dodatek materii organicznej aktywował wzrost pleśni na wykładzinie dywanowej, która w swoim składzie zawierała, oprócz włókien polimerowych poliamidowych i polipropylenowych, również naturalne włókna wełniane. Wełna jest naturalnym włóknom, zbudowanym głównie z keratyny i łatwo ulega mikrobiologicznej degradacji (Szostak-Kot, 2005).

Największe różnice między zdolnością wzrostu pleśni w budynkach oraz w warunkach laboratoryjnych obserwowano na materiałach pochodzenia nieorganicznego (gips, zaprawa). Przyczyną lepszego wzrostu grzybów w środowisku mieszkalnym mogła być obecność dodatkowych źródeł substancji pokarmowych stymulujących wzrost grzybów. W warunkach laboratoryjnych, wzrost grzybów na tych materiałach nie był możliwy bez dodatkowych źródeł węgla, np. w postaci kurzu czy pożywki mikrobiologicznej Mo. Szybkości syntezy ergosterolu na materiałach nieorganicznych, mimo obecności źródeł węgla i azotu, były najniższe. Wskazywało to na brak aktywnego wzrostu pleśni, co wynikało z istnienia warunków niekorzystnych dla rozwoju tych drobnoustrojów, w szczególności alkalicznego charakteru materiałów (wysoka wartość pH około 9-10).

W niniejszej pracy wykazano, na przykładzie płyty gipsowo-kartonowej, iż dodatek do materiałów budowlanych biocydów oraz związków hydrofobowych (silikon) skutecznie hamuje wzrost pleśni.

Czynnikiem, który mógł pobudzić grzyby do wzrostu, były prawdopodobnie zanieczyszczenia organiczne, gromadzące się z czasem na powierzchni przegród budowlanych. Kurz domowy osadzający się na powierzchniach materiałów budowlanych zawiera 60-80% związków organicznych. Stosunek węgla do azotu wynosi $C:N \approx 6,5:1$ (Korpi i in., 1997). W skład kurzu domowego wchodzi pyły nieorganiczne (np. piasek) i materia organiczna (nasiona roślin, martwe owady, roztocza, cząstki naskórka, włosów ludzi, sierść zwierząt, resztki pokarmu), będące nośnikami żywych i martwych komórek drobnoustrojów (Zyska, 2001b). Wśród związków organicznych występujących w kurzu domowym występują substancje, takie jak keratyna, celuloza, chityna oraz inne białka i wielocukry, jak również proste związki organiczne, wytworzone jako produkty metabolizmu drobnoustrojów, roztoczy i owadów. W prezentowanej pracy udowodniono, iż kurz domowy może być zatem źródłem pokarmu dla pleśni. Wykazano przy tym, iż dodatek kurzu domowego w ilości 0,01 g/próbkę czystego materiału budowlanego

o powierzchni 16 cm², przyczynia się do zwiększenia szybkości wzrostu. Obecność kurzu na materiałach celulozowych i polimerowych spowodowała zwiększenie dziesięciokrotne szybkości syntezy ergosterolu, a na materiałach nieorganicznych (zaprawa tynkarska) umożliwiła wzrost grzybom, mimo niesprzyjających warunków (wysoka wartość pH, brak substancji organicznych w materiale). Wykazano, iż szczególnie istotny wpływ na wzrost pleśni na powierzchni materiałów budowlanych ma obecność sacharydów i białek. Dodatek pożywki YES (zawierającej ekstrakt drożdżowy oraz sacharozę), w stężeniu 0,17 g/próbkę materiału o powierzchni 16 cm² spowodował znaczne przyspieszenie szybkości syntezy ergosterolu na wszystkich rodzajach materiałów, w tym również na materiałach nieorganicznych.

Czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost pleśni jest wilgotność materiału budowlanego. Pleśnie rozwijają się aktywnie przy podwyższonych wartościach wilgotności masowej, różnych w zależności od gatunku pleśni i rodzaju materiału. W niniejszej pracy oznaczono najwyższe poziomy ergosterolu i najszybsza jego synteza zachodzi przy wilgotnościach masowych: tapety 79-123%, gipsu 68%, zaprawy tynkarskiej pokrytej farbą emulsyjną 11%. Dla porównania – w suchych budynkach mieszkalnych (WWP < 60%) wilgotność masowa tapety wynosi około kilkunastu procent. W eksperymentach prowadzonych w warunkach modelowych, przy wilgotności tapety na poziomie 18%, badane pleśnie nie były zdolne do aktywnego wzrostu. Nielsen i wsp. (2004) wskazali, iż przy WWP ≈ 78% i temperaturze 20-25 °C na materiałach celulozowych może dochodzić do wzrostu grzybów z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*. W opisanych warunkach klimatycznych, wilgotność masowa papieru wynosi 12% (obliczenia na podstawie wykresu izoterm sorpcji wg Pogorzelskiego, 2009). Również w innej literaturze – Żakowska i Stobińska (2000) podają, że wartość 11% jest graniczna, poniżej której wzrost pleśni jest zahamowany. Brak wzrostu badanych pleśni przy wilgotności 18% może wynikać z różnic gatunkowych; często w obrębie rodzaju obserwuje się znaczne wahania pod względem wymagań środowiskowych (Żakowska i Stobińska, 2000).

Wzrostowi pleśni na materiałach budowlanych może towarzyszyć wydzielanie mikotoksyn do otoczenia. Wytwarzanie mikotoksyn przez pleśnie występujące w budynkach mieszkalnych oraz ich szkodliwość zdrowotna wciąż nie są w pełni wyjaśnione. Wiadomo jednak, że wiele cech fizjologicznych i biochemicznych stanowi właściwości szczepowe, które są zależne od warunków środowiska (Chełkowski, 1985). Zatem obecność gatunków zaliczanych do toksynotwórczych nie musi oznaczać obecności mikotoksyny. Potwierdziły to badania środowiskowe, przeprowadzone w budynkach w ramach niniejszej pracy. Nie wykryto bowiem mikotoksyn ani też nie stwierdzono cyto- i genotoksyczności materiałów budowlanych, mimo obecności w badanych pomieszczeniach mieszkalnych grzybów

klasyfikowanych jako toksynotwórcze. Jednakże po przeniesieniu tych grzybów na podłoża mikrobiologiczne, bogate w związki organiczne (YES), szczepy rozpoczęły syntezę mikotoksyn. W badaniach modelowych wykazano, iż szczepy należące do tych samych gatunków, lecz wyizolowane z różnych miejsc w budynkach, zasadniczo różniły się między sobą pod względem rodzaju oraz stężenia produkowanych mikotoksyn. Wskazuje to na zmienność w obrębie gatunków oraz istotny wpływ środowiska budowlanego na tworzenie mikotoksyn.

Nieliczne źródła literaturowe wskazują na obecność mikotoksyn w budynkach. Obecność ochratoksyny A wykryto w kurzu domowym (Richard i in., 1999), a roridinę oraz toksynę T2 w kurzu pobranym z systemów wentylacyjnych (Smoragiewicz i in., 1993). Z kolei Nielsen i wsp. (1999) oraz Tuomi i wsp. (2000) wykryli mikotoksyny w próbkach materiałów budowlanych. Większość autorów opiera jednak ocenę toksynotwórczości szczepów na badaniach prowadzonych w warunkach laboratoryjnych na wybranych podłożach laboratoryjnych (Sakamoto i in., 1993; Jarvis i in., 1995; Andersson i in., 1997; Cvetnic i Pepelnjak, 1997; Gravesen i in., 1999; Flannigan, 2001a; Piontek, 2004).

Bogaty skład pożywki, dostępność składników pokarmowych, stałe warunki wilgotności nie odzwierciedlają warunków panujących na/w materiałach budowlanych. Badania modelowe prowadzone w tej pracy z wykorzystaniem materiałów budowlanych sztucznie zainfekowanych grzybami, a następnie inkubowanych przy zachowaniu stałych parametrów wilgotności, temperatury, bez mikroflory towarzyszącej, pozwalają na wyjaśnienie, w jakich warunkach dochodzi do tworzenia mikotoksyn przez pleśnie.

Uzyskane wyniki dowiodły, że szczepy pleśni wyizolowane z budynków mają zdolność wzrostu i syntezy mikotoksyn na materiałach budowlanych i wykończeniowych bardzo różnych pod względem składu i właściwości fizykochemicznych. Wysoką toksynotwórczością charakteryzowały się szczepy *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* (3 szczepy), *Stachybotrys chartarum* oraz *Aspergillus ochraceus* (2 szczepy). W ramach niniejszej pracy, po raz pierwszy udowodniono możliwość tworzenia aflatoksyn (B_1 , G_1) przez szczep *Aspergillus flavus* rosnący na płycie gipsowo-kartonowej i zaprawie tynkarskiej. Wprawdzie wcześniej wskazywano już co prawda na możliwość wzrostu *Aspergillus flavus* na materiałach budowlanych, ale wykluczano zdolność pleśni do tworzenia aflatoksyn na tych materiałach (Rao i in., 1997; Ren i in., 1999; Nielsen i in., 1999; Tuomi i in., 2000).

Badany w pracy szczep *Penicillium chrysogenum* produkował znaczne ilości meleagriny i roquefortyny C podczas wzrostu na materiałach budowlanych i dodatkowo kwas sekalonowy w hodowli na pożywce MEA. Obecność meleagriny w środowisku budowlanym była już wcześniej stwierdzona przez innych autorów

(Nielsen i in., 1999). Mimo, iż szczepy *Penicillium* znane są z produkcji roquefortyny C i kwasu sekalonowego (Frisvad i Filtenborg, 1983; Ueno, 1985), to jednak w/na materiałach budowlanych mikotoksyny te nie były wcześniej wykrywane. *Aspergillus versicolor* wytwarzał sterigmatocystynę oraz wiridikatinę na wszystkich badanych podłożach i w niewielkiej ilości tentoksynę na zaprawie. Obecność sterigmatocystyny w hodowlach na materiałach budowlanych była już opisywana w badaniach innych autorów (Nielsen i in., 1999; Tuomi i in., 2000). W niniejszej pracy nie wykryto makrocyklicznych trichotecenów, produkowanych przez *Stachybotrys chartarum*, często wykrywanych przez innych autorów na materiałach budowlanych oraz na pożywkach mikrobiologicznych (Nikulin i in., 1994; Jarvis i in., 1998; Nielsen i in., 1999). Badany w pracy szczep *Stachybotrys chartarum* produkował natomiast w znacznym stężeniu stachybotrylaktam. Szczep *Aspergillus niger*, rosnący na płycie gipsowo-kartonowej oraz zaprawie, tworzył niewielkie ilości wiridikatiny oraz tentoksyny, a na pożywce MEA kwas penicylinowy. *Aspergillus ochraceus* wytwarzał na płycie gipsowo-kartonowej i pożywce MEA wiomeleinę oraz kwas penicylinowy.

W prezentowanej pracy wykazano, iż rodzaj materiału budowlanego wpływa w sposób istotny na produkcję mikotoksyn. Materiały budowlane i wykończeniowe pochodzenia celulozowego (tapety papierowe, kartony na płytach gipsowo-kartonowych, drewno, skóra) okazały się bardzo dobrym podłożem do produkcji wielu mikotoksyn, np. ochratoksyny A, aflatoksyn, roquefortyny C, sterigmatocystyny i innych związków toksycznych. W literaturze opisano możliwość tworzenia na materiałach celulozowych także innych mikotoksyn: satratoksyny, DON, T-2, verrukarolu, alternariolu i ochratoksyny A (Nielsen i in., 1999; Tuomi i in., 2000).

W niniejszej pracy wykazano również, że pleśnie są zdolne do intensywnego wzrostu i produkcji mikotoksyn na materiałach wykończeniowych, takich jak wykładzina dywanowa, PCV, skaj, natomiast na materiałach nieorganicznych (zaprawa, gips, cement) ilości wytworzonych mikotoksyn były znacznie mniejsze. Szczególnie wyraźne efekty hamowania wzrostu i syntezy ochratoksyny A oraz sterigmatocystyny zaobserwowano na płytach gipsowo-kartonowych z dodatkiem biocydów.

Porównując syntezę mikotoksyn na materiałach budowlanych oraz podłożach laboratoryjnych stwierdzono, iż pleśnie wyizolowane z mieszkań tworzyły bardziej zróżnicowane mikotoksyny i w największych ilościach na podłożu kontrolnym MEA. Ilości mikotoksyn wytworzonych na płytach gipsowo-kartonowych i zaprawie tynkarskiej były od kilkunastu do kilkuset razy mniejsze, w zależności od gatunku pleśni i rodzaju podłoża budowlanego. Jednak pleśnie zachowały zdolność do produkcji wielu mikotoksyn na materiałach budowlanych.

W większości przypadków synteza mikotoksyn była skorelowana ze wzrostem pleśni na materiałach budowlanych. Dobry wzrost i aktywny metabolizm pleśni na pożywce MEA oraz materiałach budowlanych celulozowych był warunkiem uruchomienia syntezy licznych mikotoksyn. Jednak nie zawsze ta relacja była zachowana; obserwowano bowiem pomimo słabszego wzrostu szczepów, tworzenie różnych mikotoksyn i w wysokich stężeniach, np. aflatoksyny produkowane przez *Aspergillus flavus* na płycie gipsowo-kartonowej.

Wiadomo, iż tworzenie mikotoksyn odbywa się w różnych fazach wzrostu i metabolizmu pleśni, jednak najczęściej są wytwarzane w fazie stacjonarnej. Określane jako metabolity wtórne są syntetyzowane w następstwie jakościowych zmian w pierwotnej przemianie materii, w wyniku czego dochodzi do nadprodukcji metabolitów pośrednich (Żakowska i Stobińska, 2000). Nadmiar tych metabolitów, np. reszt octanowych, może wstrzymać metabolizm pierwotny, czego konsekwencją jest ograniczone zaopatrzenie w energię (Goliński, 2010). Metabolizm wtórny wprowadza więc szlaki syntezy mikotoksyn w celu zachowania równowagi biochemicznej. W niniejszej pracy wykazano, iż produkcja mikotoksyn ulega zwiększeniu podczas wzrostu pleśni na podłożach bogatych w sacharydy, które są prekursorem wielu syntez. Nie są jeszcze poznane szlaki wytwarzania mikotoksyn, zaś same związki należą do bardzo różnych grup; są to pochodne benzopirenu, kumaryny, antrachinonu, laktonów, cyklicznych peptydów, cyklicznych sterydów, epoksydów seskwiterpenowych i innych związków (Chełkowski, 2010). Przypuszcza się, że ta sama mikotoksyna może być syntetyzowana w różnych szlakach metabolicznych (Goliński, 2010). Sam metabolizm jest więc czynnikiem, który grzyby wykorzystują do swoich potrzeb w określonych warunkach środowiska.

Potwierdzeniem tezy, iż toksynotwórczość izolatów pleśni pochodzących z budynków należy badać na materiałach budowlanych, jest wykazanie produkcji niektórych mikotoksyn tylko w obecności określonych materiałów budowlanych. Tentoksyna była wytwarzana wyłącznie przez szczepy *Aspergillus versicolor* rosnące na zaprawie tynkarskiej, a kwas 3-nitropropionowy – przez *Aspergillus flavus* rosnący na płycie gipsowo-kartonowej i zaprawie. Nie wykrywano tych toksyn na podłożu kontrolnym MEA. Wymienione mikotoksyny różnią się budową chemiczną, tentoksyna należy do tetrapeptydów, a kwas 3-nitropropionowy jest pochodną kwasu propionowego. Środowisko budowlane może zatem ukierunkowywać metabolizm pleśni na produkcję specyficznych mikotoksyn, tworzonych w niesprzyjających dla wzrostu grzybów warunkach, np. zbyt ubogi skład chemiczny środowiska lub zbyt wysokie pH.

Stwierdzony w pierwszym etapie badań brak syntezy mikotoksyn na przegrodach budowlanych można wytłumaczyć niedostateczną dostępnością związków organicznych w postaci sacharydów czy białek. Badania laboratoryjne wykazały,

że *Aspergillus ochraceus* na czystych materiałach, bez dodatkowych źródeł węgla i azotu, rośnie bardzo wolno i nie produkuje ochratoksyny A (z wyjątkiem skóry, w której obecne są związki organiczne). Dopiero obecność związków organicznych obecnych w kurzu była bodźcem do syntezy OTA. Intensywniejszą produkcję tej toksyny obserwowano również na materiałach budowlanych, do których dodano pożywkę YES.

Pleśnie znane są ze swoich zdolności hydrolitycznych, dzięki czemu mogą one w odpowiednich warunkach wilgotności rozkładać materię organiczną obecną w kurzu domowym. W literaturze podaje się, iż występowanie takiego źródła węgla i azotu może wystarczyć do wzrostu grzybów na kamieniach oraz innych materiałach nieorganicznych i przyczyniać się do ich biodeterioracji (Cwalina, 2003). W ten sposób grzyby mogą przetrwać w niekorzystnych warunkach na starych zabytkowych freskach, ceglach, kamieniach, obrazach (Karpovich-Tate i Rebrikova, 1991; Pepe i in., 2010).

W pracy wykazano, iż obecność kurzu domowego wystarcza pleśniam do wzrostu i wytwarzania mikotoksyn.

Czynnikiem sprzyjającym produkcji mikotoksyn, podobnie jak i rozwojowi grzybów, jest odpowiednio wysoki poziom wilgotności masowej materiału budowlanego. Badania tapety wykazały, że im wyższa jest wilgotność masowa materiału, tym produkcja mikotoksyn przez pleśnie jest większa. Pokazano przy tym, że między gatunkami pleśni występują znaczne różnice w minimalnych wymaganiach dotyczących warunków niezbędnych do syntezy mikotoksyn. Podobne są spostrzeżenia zespołu Nielsena i in. (2004), którzy badali wpływ temperatury i wilgotności powietrza na produkcję mikotoksyn podczas wzrostu pleśni na materiałach budowlanych. Autor stwierdził, iż szczepy z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus* lepiej rosną i produkują większe ilości mikotoksyn przy wilgotności powietrza 95%, niż gatunki z rodzaju *Eurotium*, wymagające znacznie wyższego poziomu wilgotności.

Zbyt niska wilgotność materiałów budowlanych w pomieszczeniach mieszkalnych może być czynnikiem ograniczającym wzrost i produkcję mikotoksyn. W badaniach laboratoryjnych opisanych w tej pracy wykazano, iż spadek wilgotności masowej tapety do poziomu 18% powoduje hamowanie wzrostu grzybów i syntezy mikotoksyn. W budynkach, w których temperatura wynosiła 20-22 °C i WWP powyżej 80%, zawilgocenie sorpcyjne papieru było niskie, około 14-16%, nie obserwowano rozwoju grzybów i produkcji mikotoksyn.

Podsumowując – udowodniono, iż w warunkach laboratoryjnych toksynotwórcze pleśnie są zdolne do wytwarzania mikotoksyn na materiałach budowlanych. Produkcji tej sprzyja obecność sacharydów i białek oraz wysoka wilgotność masowa materiału budowlanego. Obserwowany brak mikotoksyn na przegrodach

budowlanych w mieszkaniach może wynikać z niesprzyjających warunków do ich syntezy. Należy jednak rozważyć możliwość występowania mikotoksyn, ale w ilościach poniżej progu wykrywalności metodą stosowaną w pracy. Mikotoksyny w mieszkaniach oznaczano w ekstraktach uzyskanych z wymazów z przegród budowlanych. Ilości materiału biologicznego użytego do ekstrakcji mikotoksyn były znacznie mniejsze, niż w badaniach laboratoryjnych, gdzie do analizy wykorzystywano cały materiał budowlany porośnięty pleśnią. Ponieważ mikotoksyny mogą być kumulowane w zarodnikach i w grzybni, jak również wydzielane do środowiska – badania całych próbek materiałów budowlanych stwarzały możliwość wykrycia obecności tych związków. Stąd wniosek, iż w warunkach mieszkalnych toksynotwórczość pleśni należy oznaczać w całych próbkach materiałów budowlanych pobranych wraz z grzybnią.

Wyniki przeprowadzonych badań środowiskowych nie potwierdziły cytotoksyczności zagrzybionych przegród budowlanych, jednak w badaniach laboratoryjnych wykazano, iż materiały budowlane porażone przez pleśnie były cytotoksyczne. Smith i in. (1992) na podłożach modelowych wykazał, iż efekty cytotoksyczne wywołuje 50% izolatów *Aspergillus* i *Penicillium* pochodzących z budynków mieszkalnych.

W niniejszej pracy udowodniono, że mikotoksyny produkowane przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych oddziaływały cytotoksycznie na fibroblasty mysie. Najbardziej cytotoksyczne były materiały budowlane porośnięte pleśniami *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus* i *Penicillium chrysogenum*. W materiałach tych wykryto sterigmatocystynę, wiridikatyne, aflatoksyny, roquefortynę C i meleagrinę. Wysoka cytotoksyczność ekstraktu zawierającego aflatoksyny potwierdziła właściwości toksyczne szczepu *Aspergillus flavus*. Wiadomo, że sterigmatocystyna jest związkiem kancerogennym i cytotoksycznym (Ueno, 1985; Bünger i in., 2004) szczególnie wobec komórek płuc. W prezentowanej pracy potwierdzono wysoką cytotoksyczność sterigmatocystyny oraz ekstraktów z materiałów budowlanych porośniętych *Aspergillus versicolor* wobec fibroblastów mysich. Wzmoczony efekt cytotoksyczny mógł wynikać dodatkowo z obecności na materiałach budowlanych wiridikatyne oraz tentoksyny, które znane są z oddziaływań na błony komórkowe oraz hamowania Na⁺/K⁺ ATP-azy (Gwoździński i in., 1991; Pavlova i in., 2004). W aktualnie prezentowanych badaniach wykazano, że ekstrakty *Penicillium chrysogenum* zawierające roquefortynę C, meleagrinę i kwas sekalonowy również były cytotoksyczne wobec fibroblastów mysich. Wcześniejsze badania wskazywały, iż roquefortyna C hamuje w nieznacznym stopniu proliferację limfocytów, a kwas sekalonowy może być inhibitorem tworzenia różnych enzymów, np. cykazy adenylowej biorącej udział w syntezie cyklicznego cAMP, a także kinaz katalizujących reakcje fosforylacji białek (Hanumegowda i in.,

2002; Keblys i in., 2004). Jak dotąd – w literaturze nie opisywano badań dotyczących aktywności biologicznej meleagriny, wytwarzanej przez *Penicillium chrysogenum* na materiałach budowlanych.

Nie obserwowano cytotoksyczności w przypadku badania materiałów budowlanych porośniętych szczepem *Cladosporium cladosporioides*, który nie produkował mikotoksyn, a także gatunkami innych pleśni, które wytwarzały nieliczne mikotoksyny i w niskich stężeniach (*Aspergillus niger* i *Aspergillus ochraceus*). Potwierdza to rolę tylko niektórych pleśni i mikotoksyn wytwarzanych przez pleśnie na materiałach budowlanych w oddziaływaniu cytotoksycznym wobec fibroblastów mysich. Jednak brak efektów cytotoksycznych nie może nas uspokajać, bowiem produkcja mikotoksyn na materiałach budowlanych jest niestabilna – zależy zarówno od czynników środowiska, jak również od właściwości szczepu. Uzyskane wyniki sugerują, że zły stan zdrowia mieszkańców zagrzybionych budynków może wynikać właśnie z oddziaływań cytotoksycznych.

Do badań cytotoksyczności ogólnej wybrano komórki fibroblastów mysich. W ekstraktach z materiałów budowlanych zwykle mamy do czynienia z mieszaninami mikotoksyn, które oddziałują na różne rodzaje komórek. Stwierdzono, że fibroblasty mogą mieć zastosowanie do badania cytotoksyczności ogólnej zagrzybionych materiałów budowlanych ze względu na brak specyficzności fibroblastów wobec mikotoksyn.

Badania prowadzono również na czystych preparatach mikotoksyn: aflatoksynie B₁ oraz sterigmatocystynie. Porównując efekty cytotoksyczne w warunkach stężeń mikotoksyn obecnych w roztworach standardowych oraz stężeń mikotoksyn wytworzonych w hodowlach prowadzonych na materiałach budowlanych stwierdzono, iż efekt cytotoksyczny próbek materiałów budowlanych jest znacznie większy niż preparatów mikotoksyn, pomimo wykrywania mikotoksyn w niższych stężeniach. Badania toksyczności prowadzone przez Gräbsch i in. (2006) z wykorzystaniem roztworów standardowych pojedynczych mikotoksyn – gliotoksyny, patuliny i sterigmatocystyny oraz ich mieszanin, wykazały dwukrotnie większe oddziaływanie cytotoksyczne mieszaniny, mimo zachowania tych samych stężeń.

Zwiększony efekt cytotoksyczny ekstraktów zawierających różne metabolity pleśni prawdopodobnie wynika z synergistycznego działania mikotoksyn oraz obecności innych metabolitów. We wcześniejszych badaniach dotyczących wzrostu i aktywności metabolicznej pleśni na materiałach budowlanych stwierdzono wysoką produkcję kwasów organicznych (Gutarowska i Czyżowska, 2009). Obecność kwaśnych metabolitów może w istotny sposób zwiększyć cytotoksyczność mikotoksyn przez ułatwianie ich przenikania przez błony cytoplazmatyczne.

Wykazano również, iż niektóre materiały budowlane (skóra, cement) oddziałują cytotoksycznie na komórki fibroblastów mysich. Daje to podstawę do twierdzenia, iż cytotoksyczność materiałów budowlanych porażonych przez pleśnie może być sumą oddziaływań materiału oraz metabolitów grzybów.

Przeprowadzone w pracy badania genotoksyczności zagrzybionych przegród budowlanych nie wskazywały na istnienie takich oddziaływań. Nie stwierdzono również w badaniach laboratoryjnych ani genotoksyczności materiałów budowlanych porażonych przez pleśnie, ani też czystych preparatów mikotoksyn.

W literaturze przedmiotu jest wiele prac, w których autorzy wskazują na genotoksyczność mikotoksyn wytwarzanych przez pleśnie. Efekty takie wykazano dla aflatoksyny B1, B2, G1, G2, sterigmatocystyny, kwasu penicylinowego, ochratoksyny A. Badania prowadzono na różnych komórkach, np. ludzkich limfocytach, komórkach raka okrężnicy, komórkach bakterii *E. coli* oraz *Salmonella* sp. i innych (Krivobole i in., 1987; Casteel i Rottinghaus, 2000; Sabater-Vilar i in., 2003; Bächler i in., 2009). Badania Nieminen i in. (2002) wykazały, że ekstrakty *Aspergillus fumigatus* ze środowiska budowlanego, w których znajdowały się takie mikotoksyny, jak gliotoksyna, penitrem A, werrukulogen czy werrukosydyna, oddziaływały genotoksycznie w teście z komórkami *E. coli*. Brakuje jednak badań dotyczących oddziaływań genotoksycznych ekstraktów z materiałów budowlanych porażonych przez pleśnie oraz badań wykonanych z użyciem zastosowanej w niniejszej pracy metody MLA, która jest rekomendowana przez Dyrektywę 67/548/EWG, Gatehouse, 2002. Nie można zatem całkowicie wykluczyć oddziaływania genotoksycznego zagrzybionych środowisk budowlanych. W przyszłości należałoby rozpatrzyć, jaka metoda byłaby odpowiednia do takiej oceny.

W badaniach środowiskowych zarejestrowano częste objawy alergii u ludzi zamieszkujących pomieszczenia zagrzybione. Wskazano, iż białka alergenne wytwarzane przez pleśnie należą do podstawowych czynników wpływających na zdrowie mieszkańców. W badaniach modelowych prowadzonych na materiałach budowlanych udowodniono, że pleśnie wyizolowane z budynków były zdolne do produkcji licznych potencjalnie alergennych białek. Stwierdzono, iż profil tych białek zmienia się w zależności od rodzaju materiału budowlanego. Na materiałach organicznych, zawierających celulozę (płyta gipsowo-kartonowa, tapeta) pleśnie produkowały znacznie więcej białek alergennych niż na materiałach mineralnych (gips, zaprawa). Ponadto wykazano, iż materiały celulozowe bardziej sprzyjały produkcji alergenów przez pleśnie niż podłoża mikrobiologiczne (Mo, MEA). Pleśnie wytwarzały białka specyficzne dla danego podłoża. W eksperymentach wykonanych przez Al-Suwaini i in. (2001) oraz Vijay i in. (2005) wykazano, że pleśnie z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* hodowane na

podłożu Czapka oraz podłożu BBL (Difco) produkowały mniej białek niż na podłożach laboratoryjnych wykorzystywanych w tej pracy. Masy cząsteczkowe tych białek były znacznie mniejsze niż wykryte w prezentowanych badaniach. Także Little i in. (1993) wskazywali, że warunki hodowli wpływają na produkcję alergenów przez pleśnie należące do rodzaju *Aspergillus*, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

W prezentowanej pracy ujawniono również, iż alergeny mogą być wytwarzane w środowisku budowlanym w warunkach mniej korzystnych, niż wymagane do syntezy mikotoksyn. Wykazano bowiem zdolność pleśni do tworzenia alergenów w budynkach oraz udowodniono, iż do produkcji alergenów wystarcza tylko niewielka ilość substancji organicznej na materiałach budowlanych oraz odpowiednia wilgotność materiału. Produkcja mikotoksyn wymaga natomiast dużej wilgotności materiału budowlanego oraz dodatkowej ilości materii organicznej.

Badania białek alergennych na materiałach budowlanych mogą mieć również zastosowanie w praktyce diagnostycznej. Materiały budowlane mogą być wykorzystane jako podłoża do otrzymywania ekstraktów alergenów wykorzystywanych do diagnostyki alergii na pleśnie, rozwijające się w budynkach mieszkalnych.

W przedstawionych badaniach stwierdzono, iż na materiałach budowlanych produkowane były liczne białka alergenne, zarówno sklasyfikowane, jak również dotąd nieopisane w literaturze. Natomiast nie potwierdzono produkcji wszystkich tych białek na podłożach mikrobiologicznych, czego przykładem jest alergen *P. expansum* o masie cząsteczkowej 88 kDa, który był wytwarzany tylko w warunkach wzrostu pleśni na tapecie, a który reagował ze wszystkimi badanymi surowicami.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można wskazać, jakie analizy laboratoryjne należy wykonać, aby określić rzeczywisty stopień zagrożenia zdrowotnego dla mieszkańców zagrzybionych pomieszczeń. W tym celu należy ocenić toksynotwórczość, cytotoksyczność i alergenność pleśni wyizolowanych z przegród budowlanych, prowadząc badania laboratoryjne z użyciem materiałów budowlanych. W badaniach należy wykorzystać odpowiedni materiał budowlany – w zależności od miejsca izolowania szczepu (preferowane są materiały celulozowe) oraz prowadzić hodowle pleśni w obecności materii organicznej i przy zachowaniu wysokiej wilgotności masowej materiału. Ekstrakcje związków toksycznych i alergennych należy prowadzić z całych próbek materiałów budowlanych porośniętych grzybnia, a nie z wymazów. Dobrą wykrywalność badanych cech, wskazujących na zagrożenia zdrowotne ludzi dają metody analityczne wykorzystywane w pracy: oznaczanie mikotoksyn metodą HPLC – MS/MS, cytotoksyczności metodą MTT lub XTT w hodowlach fibroblastów mysich, rozdział białek alergennych metodą SDS-PAGE. W ocenie zdrowia mieszkańców, obok badania lekarskiego, należy potwierdzić alergię na pleśnie metodą

immunoblottingu z wykorzystaniem szczepów pleśni wyizolowanych z budynku, hodowanych na materiałach budowlanych.

Niniejsza praca powstała w odpowiedzi na pojawienie się problemu często występującego zagrzybienia w budynkach mieszkalnych i ich wpływu na zdrowie mieszkańców. Charakterystyka wzrostu pleśni wyizolowanych z budynku, warunków produkcji przez nie mikotoksyn i alergenów podczas wzrostu na materiałach budowlanych, a także oddziaływań cyto- i genotoksycznych na komórki organizmów wyższych, daje podstawy do dalszych pogłębionych badań naukowych. Pozostają do wyjaśnienia przyczyny tworzenia i zróżnicowania mikotoksyn produkowanych przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych, a także wpływ kwaśnych metabolitów na wzrost cytotoksyczności mikotoksyn. Biorąc pod uwagę fakt, iż dopiero w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie środowiska naukowego zagadnieniami, zmierzającymi do poznania mechanizmów syntezy mikotoksyn, można przewidywać, że postawione w pracy pytania znajdą swoje wyjaśnienie.

6. WNIOSKI

1. Aktywny rozwój grzybów strzępkowych występuje w mieszkaniach, w których wilgotność powietrza przekracza 60%. W takich warunkach pleśnie zasiedlają większość materiałów budowlanych, wykończeniowych i termoizolacyjnych stosowanych we współczesnym budownictwie. Materiały pochodzenia organicznego, zwłaszcza zawierające celulozę i/lub białka, sprzyjają wzrostowi pleśni – w przeciwieństwie do materiałów nieorganicznych.
2. W mieszkaniach, w których koncentracja pleśni na przegrodach budowlanych przekracza 10^6 jtk/100 cm², a ich stężenie w powietrzu jest większe niż 5×10^2 jtk/m³ (co odpowiada stężeniu ergosterolu powyżej 2 µg /m³), często u mieszkańców występują alergie oraz objawy Zespołu Chorego Budynku (SBS).
3. W mieszkaniach zagrzybionych – wśród powszechnych dla budynków grzybów *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Trichoderma* – dominują pleśnie z rodzajów: *Aspergillus* (głównie gatunki *A. versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*), *Stachybotrys*, *Ulocladium* i *Paecilomyces*.
4. Nie wykryto mikotoksyn w mieszkaniach, w których wykazano wzrost grzybów strzępkowych na przegrodach budowlanych. Zdolność wytwarzania toksyn przez pleśnie izolowane z mieszkań ujawniła się jednak podczas ich hodowli w warunkach laboratoryjnych – zarówno na pożywkach, jak i na materiałach budowlanych. Powszechnie występujące w zagrzybionych mieszkaniach gatunki: *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum*, hodowane w warunkach laboratoryjnych, wykazują zdolność produkcji groźnych dla zdrowia mikotoksyn: aflatoksyny B₁, G₁, sterigmatocystyny, roquefortyny C, meleagriny i wielu innych. Świadczy to o możliwości występowania toksycznych metabolitów także w zagrzybionych mieszkaniach.
5. Wzrost oraz produkcja mikotoksyn i alergenów przez grzyby strzępkowe zasiedlające materiały budowlane są zdeterminowane wysoką wilgotnością podłoża i dostępnością nawet niewielkich ilości materii organicznej. Obecność sacharydów i białek stymuluje wzrost i syntezę mikotoksyn przez pleśnie na materiałach budowlanych, z wyjątkiem cementu. Procesy te mogą być indukowane przez kurz domowy osiadający na powierzchni przegród budowlanych. Wzrost grzybów i synteza mikotoksyn mogą być skutecznie hamowane przez dodatek biocydu i związku hydrofobowego (np. silikonu). Wprawdzie biocydy umożliwiają ochronę materiałów budowlanych, ale najskuteczniejszym sposobem zapobiegania rozwojowi pleśni jest ograniczanie dostępności wody.
6. Wysoka wilgotność masowa materiału sprzyja rozwojowi grzybów strzępkowych i syntezie mikotoksyn. Zależnie od gatunku pleśni, poziom

wilgotności masowej tapety w granicach od 79% do 123% jest korzystny dla aktywacji rozwoju określonego typu pleśni. Na zaprawie zaobserwowano wzrost pleśni przy wilgotności masowej powyżej 5%, na gipsie przy wilgotności 33%.

7. Grzyby strzępkowe rozwijające się w mieszkaniach wytwarzają białka o właściwościach alergennych. Białka te najczęściej produkowane są przez pleśnie: *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus flavus* i *Aspergillus niger*. Najczęściej reakcję alergiczną u mieszkańców zagrzybionych budynków wywołują białka tworzone przez *Penicillium expansum* – o masach cząsteczkowych 88 kDa i 70 kDa (Pen c 19), a także przez *Alternaria alternata* – o masach cząsteczkowych 30 kDa (Alt a 1) i 53 kDa (Alt a 10).
8. Materiały budowlane sprzyjają syntezie białek alergennych przez grzyby strzępkowe. Wśród mikotoksyn i alergenów tworzonych przez pleśnie rosnące na materiałach budowlanych występują takie, których grzybnia nie syntetyzuje podczas wzrostu na pożywkach mikrobiologicznych. Należą do nich: tentoksyna, kwas 3-nitropropionowy oraz liczne białka alergenne o masach cząsteczkowych od 11 kDa do 93 kDa.
9. Materiały budowlane, na których rozwijają się grzyby strzępkowe są cytotoksyczne dla fibroblastów mysich. Za cytotoksyczność są głównie odpowiedzialne mikotoksyny. Wyższa cytotoksyczność materiałów budowlanych porażonych przez toksynotwórcze pleśnie, w porównaniu z czystymi preparatami mikotoksyn, może być wynikiem synergistycznego oddziaływania toksyn i innych metabolitów tworzonych w tych warunkach.
10. Grzyby strzępkowe rosnące na materiałach budowlanych wytwarzają szerokie spektrum białek, wśród których wykryto 39 białek alergennych, w tym 16 białek o masach cząsteczkowych od 21 do 93 kDa, dotąd nie opisanych przez International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee, a także 23 białka opisane i sklasyfikowane.
11. Ekstrakty białek alergennych wytwarzanych przez grzyby strzępkowe rosnące na materiałach budowlanych powinny być używane jako markery diagnostyczne w badaniach reakcji uczuleniowych na alergeny pleśni – w celu ułatwienia i zwiększenia szansy wykrycia alergii u mieszkańców zagrzybionych budynków.
12. Ocena zagrożenia zdrowotnego mieszkańców zagrzybionych budynków wymaga oznaczania toksynotwórczości, cytotoksyczności i alergenicności pleśni wyizolowanych z przegród budowlanych, w hodowlach laboratoryjnych prowadzonych na materiałach budowlanych, w warunkach wilgotności i zanieczyszczenia kurzem, odpowiadających tym, jakie występują w budynkach.

LITERATURA

- Abin L., Coto O., Gomez Y., Bosecker K. (2002) Screening of fungi with capacity for organic acid production. *Biological Reviews* 16: 69-71.
- Aleksandrowicz J., Smyk B. (1970) Mikotoksyny i ich rola w onkogenezie ze szczególnym uwzględnieniem chorób krwi. *Medycyna Weterynaryjna* 10: 600-604.
- Aleksandrowicz J., Smyk B. (1973) The association of neoplastic diseases and micotoxins in the environment. *Texas Reports on Biology and Medicine* 31: 715-726.
- Allessandrini G., Bonecchi R., Peruzzi R., Toniolo L., Fedeli E. (1989) Caratteristiche composizionali e morfologiche di pellicole ad ossalato: studio comparato su substrati lapidei di diversa natura. W: *Proceedings International Symposium: The Oxalate Films: Origin and significance in the conservation of works of art*. Milan: 137-151.
- Al-Suwaini A.S., Bahkali A.H., Hasnain S.M. (2001) Airborne viable fungi in Riyadh and allergenic response of their extracts. *Mycoses* 44: 401-406.
- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* Typhimurium microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31: 347-364.
- Amman H.M. (2006) Czy zanieczyszczenie pleśniami wewnątrz pomieszczeń jest niebezpieczne dla zdrowia? W: Grajewski J. (Ed) *Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenie dla człowieka i zwierząt*. Wyd. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Bydgoszcz, 35-45.
- Andersson M.A., Nikulin M., Koljalg U., Andersson M.C., Rajney F., Rejula K., Hintikka E.L., Salkinoja-Salonen M. (1997) Bacteria, molds and toxins in water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 2: 387-393.
- Arkusz J., Stępnik M., Stańczyk M., Lewińska D., Gutarowska B., Piotrowska M. (2007) Evaluation of mutagenic potential of mold extracts isolated from buildings using the mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay (MLA). *Polish Journal of Environmental Study* 16 (6): 807-815.
- Arshold S.H., Bateman B., Matthews S.M. (2003) Asthma – primary prevention of asthma and atopy during childhood by allergen avoidance in infancy: a randomized controlled study. *Thorax* 58: 489-493.
- Aukrust L., Borch S.M., Einarsson R. (1985) Mold allergy – spores and mycelium as allergen sources. *Allergy* 40: 245-254.
- Bächler S., Fehr M., Pahlke G., Marko D. (2009) Impact of alternariol monomethyl ether on Nrf2 translocation in human tumor cells. 31st Mycotoxin Workshop, Münster: 97.

- Barabasz W., Jaśkowska M. (2001) Aspekty zdrowotno-toksykologiczne występowania grzybów pleśniowych w budynkach mieszkalnych i inwentarskich. II Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 98-108.
- Barabasz W., Pikulicka-Dziurman A. (2009) Grzyby toksynotwórcze w budownictwie mieszkaniowym. V Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 114.
- Baran E. (1998) Zarys mikologii lekarskiej. Wyd. Volumed, Wrocław.
- Barnes C., Buckley S., Pacheco F., Portnoy J. (2002) IgE-reactive proteins from *Stachybotrys chartarum*. *Annals Allergy Asthma Immunology* 89 (1): 29-33.
- Behrendt H., Lemmen C. (2002) Schimmelpilz-Exposition: Pathomechanismus und Krankheitsbilder. W: Mücke W. (Ed) Schimmelpilze im Wohnbereich. Wyd. D.M Gräbner, Bamberg, 85-107.
- Bellmann R., Bellmann-Weiler R., Weiler S. (2008) Pulmonary mycoses. *Magazine of European Medical Oncology* 1(3): 15-19.
- Benndorf D., Müller A., Bock K., Manuwald O., Herbarth O., von Bergen M. (2008) Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. *Allergy* 63: 454-460.
- Bennett J.W., Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 36: 497-516.
- Betina V. (1989) Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. W: Bioactive molecules, Vol. 9, Wyd. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 438.
- Bisby F.A., Roskov Y.R., Orrell T.M., Nicolson D., Paglinawan L.E., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., Baillargeon G. (2009) Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2009 Annual Checklist. Dostępny na stronie od 8.01.2010: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2009/>
- Bjurman J. (1994) Ergosterol as an indicator of mould growth on wood in relation to culture age, humidity stress and nutrient level. *International Biodeterioration and Biodegradation* 33: 355-368.
- Bjurman J., Kristensson J. (1992) Volatile production by *Aspergillus versicolor* as a possible cause of odor in houses affected by fungi. *Mycopathologia* 118: 173-178.
- Bogacka E. (2004) Astma oskrzelowa u osób z alergią na grzyby. XV Ogólnopolskie Sympozjum Szkoleniowe i Warsztaty Alergologiczne: Alergia pokarmowa i wziewna na pleśnie. Dobieszków: 8.
- Bogacka E. (2008) Alergia na grzyby pleśniowe. *Polski Merkuriusz Lekarski, Supl.* 1:11-14.
- Bogusławska-Kozłowska J., (1997) Wpływ błędów projektowania i wykonawstwa na rozwój pleśni w nowoczesnych mieszkaniach. IV Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mikologów Budownictwa: Ochrona obiektów budowlanych przed korozją biologiczną i ogniem. Szklarska Poręba: 33-39.

- Börjesson T.S., Stöllman U.M., Adamek P., Kasprsson A. (1990) Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3705-3710.
- Börjesson T.S., Stöllman U.M., Schnürer J.L. (1993) Off-odorous compounds produced by molds on oatmeal agar: identification and relation to other growth characteristic. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41: 2104-2111.
- Boutibonnes P. (1980) Antibacterial activity of some mycotoxins. *IRCS Medical Science Journal* 8: 850-851.
- Brasel T.L., Douglas D.R., Wilson S.C., Straus D.C. (2005) Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichotecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 114-122.
- Breitenbach M., Cramer R., Lehre S.B. (2002) Fungal Allergy and Pathogenicity. W: Adorini L., Arai K., Berek C., Scmitt-Verhulst A.M. (ed.) *Chemical Immunology*, vol. 81, wyd. Karger, Basel, Szwajcaria.
- Brunekreef B. (1992) Damp housing and adult respiratory symptoms. *Allergy* 47: 498-502.
- Brunekreef B., Dockery D.W., Speizer F.E., Ware J.H., Spengler J.D., Ferris B.G. (1989) Home dampness and respiratory morbidity in children. *The American Review of Respiratory Disease* 140: 1363-1367.
- Buchmiet E., Żakowska Z. (2009) Toksynotwórczość pleśni na materiałach budowlanych. V Konferencja Naukowa Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź: 129.
- Bünger, J., Westphal, G., Mönnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., Müller, M. (2004) Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* 202: 199-211.
- Burr M.I., Mullins J., Merrett T.G., Scott N.C.H. (1988) Indoor moulds and asthma. *Journal of Royal Society of Health* 3: 99-101.
- Bush R.K., Portnoy J.M., Saxon A., Terr A.I., Wood R.A. (2006) The medical effects of mold exposure. *Journal Allergy Clinical Immunology* 117: 326-333.
- Casteel M., Nielsen C., Didier A., Dietrich R., Märtlbauer E. (2009) Inhibitory and activating effects of deoxynivalenol on the MAPK signalling pathway. 31st Mycotoxin Workshop, Münster: 99.
- Casteel S.W., Rottinghaus G.E. (2000) Mycotoxins. W: Lederberg J. (ed.) *Encyclopedia Microbiology* (2nd ed.), Vol. 3, Wyd. Academic Press, San Diego, California, 337-348.
- Chapman M.D. (2006) Challenges associated with indoor moulds: health effects, immune response and exposure assessment. *Medical Mycology* 44: 529-532.
- Chełkowski J. (1985) Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i miko toksykozy. Wyd. SGGW – AR, Warszawa.

- Chełkowski J. (1999) Pleśnie i mikotoksyny. W: Ryniecki A., Szymański P. (ed.) Dobrze przechowywane zboże. Wyd. MR INFO Towarzystwo Umiejętności Rolniczych, Poznań, 6-7.
- Chełkowski J. (2010) Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i miko toksykozy. Wyd. Instytut Genetyki Roślin, PAN Poznań.
- Chew G.L. (2001) Fungal extracellular polysaccharides, (1 → 3)-β-D-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air* 11: 171-178.
- Clements J. (2000) The mouse lymphoma assay. *Mutation Research* 455(1-2): 97-110.
- Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A., Straus D.C. (1998) Correlation between the prevalence of certain fungi and Sick Building Syndrome. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 14(3): 261-274.
- Creasia D.A., Thurman J.D., Jones L.J. III, Nealley M.L., York C.G., Wannemacher R.W., Bunner D.L. (1987) Acute inhalation toxicity of T-mycotoxin in mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 8(2): 230-235.
- Cvetinic Z., Pepeljnjak S. (1997) Distribution and mycotoxin-producing ability of some fungal isolates from the air. *Atmospheric Environment* 33:491-495.
- Cwalina B. (2003) Korozja kamienia i betonu wzbudzona przez drobnoustroje. II Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź: 38-50.
- Cwalina B., Zyska B. (2005) Mineralne materiały budowlane – kamień, beton, cegła, zaprawy budowlane, szkło. W: Zyska B., Żakowska Z. (ed.) Mikrobiologia materiałów, Wyd. Politechnika Łódzka, Łódź, 377-406.
- Czerwiecki L. (2000) Oznaczanie mikotoksyn-problemy analityczne. V Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Mikotoksyny i dioksyne a środowisko. Bydgoszcz: 85-91.
- D'Amato G., Chatzigeorgiou G., Corsico R., Gioulekas D., Jager L., Jager S. (1997) Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. *Allergy* 52: 711-716.
- Dales R.E., Zwanenburg H., Burnett R., Franklin C.A. (1991) Respiratory health effects of home dampness and molds among Canadian children. *American Journal of Epidemiology* 134: 196-203.
- De La Torre M.A., Gomez-Alarcon G., Melgarejo P., Saiz-Jimenez C. (1991) Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Science of the Total Environment* 107: 159-168.
- Dearborn D.G., Infeld M.D., Smith P.J.C., Horgan T.E., Allan T., Zimomra J.A., Mortensen B.K., Burkett S.A., Winpisingerslay K, Wagner S. (1994) Acute pulmonary hemorrhage/hemosiderosis among infants – Cleveland, Ohio 1993-1996 – November 1994. *CDC Morbidity and Mortality Weekly Report* 43: 881-883.

- Dearborn D.G. i 15 innych współautorów (1997) Update: Pulmonary hemorrhage/hemosiderosis among infants – Cleveland, Ohio, 1993-1996. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 46: 33-35.
- Denning D.W. (2006) *Aspergillus* and aspergillosis – progress on many fronts. Medical Mycology 44(S1): 269.
- Doleżał M. (1989) Grzyby pleśniowe w budownictwie a zdrowotność pomieszczeń. Biuletyn Informacyjny: Użytkowanie, Konstrukcje, Remonty 1-2: 62-70.
- Doleżał M. (1992) Wybrane aspekty warunków higieniczno-zdrowotnych mikrośrodowiska mieszkań a ich skażenie grzybami pleśniowymi. Sympozjum Naukowe: Aspekty higieniczno-zdrowotne ochrony i kształtowania środowiska, Warszawa 1991: 111-119.
- Douwes J., Doekes G., Montijn R., Heederik D., Brunekreef B. (1997) An immunoassay for the measurements of (1→3)-β-D-glucanans in the indoor environment. Mediators of Inflammation 6: 257-262.
- Dynowska M. (2006) Kliniczne aspekty zakażeń grzybami pleśniowymi. W: Grajewski J. (ed.) Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenie dla człowieka i zwierząt. Wyd. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, Bydgoszcz, 67-73.
- Dzierżanowska D. (2006) Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia. Wyd. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała.
- Eckhardt F.E.W. (1978) Microorganisms and weathering of a sandstone monument. W: Krumbein W.E. (Ed) Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology. The Terrestrial Environment. Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 675-686.
- Elidemir O., Colasurdo G.N., Rossman S.N., Fan L.L. (1999) Isolation of *Stachybotrys* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. Pediatrics 104: 964-966.
- Ezeonu I.M., Noble J.A., Simmons R.B., Allan T., Horgan T.E., Dearborn D.G. (1994) Effect of relative humidity on fungal colonization of fibreglass insulation. Applied and Environmental Microbiology 60: 2149-2151.
- Fadel R., David B., Paris S., Guesdon J.L. (1992) *Alternaria* spore and mycelium sensitivity in allergic patients: *in vivo* and *in vitro* studies. Annals of Allergy, Asthma and Immunology 69: 329-335.
- Fadel R., Paris S., Fitting C., Rassemont R., David B. (1986) A comparison of extracts from *Alternaria* spores and mycelium. Journal of Allergy and Clinical Immunology 77: 242.
- Falkiewicz-Dulik M. (2005) Skóra, wyroby skórzone i pergamin. W: Zyska B., Żakowska Z. (ed.) Mikrobiologia materiałów. Wyd. Politechnika Łódzka, 187- 226.
- Fassatióv O. (1983) Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa.

- Fiedler K., Schütz E., Geh S. (2001) Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 204: 111-121.
- Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U., Lund F. (1996) Screening methods for secondary metabolites produced by fungi in pure culture. W: Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (ed.) *Introduction to food and air borne fungi*. Wyd. Centraalbureau voor schimmelcultures. Utrecht, The Netherlands, 270-273.
- Fink-Gremmels J. (1999) Mycotoxins. W: D'Mello J.P.F., Duffus C.M., Duffus J.H. (ed.) *Toxic substances in crop plants*. Wyd. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 226-257.
- Flannigan B. (2001b) Microbial aerosols in buildings: origin, health implications and controls. II Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 11-27.
- Flannigan B., McCabe E., McGarry F. (1991) Allergic and toxigenic microorganisms in houses. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 61-73.
- Flannigan B., Miller J.D. (1994) Health implications of fungi in indoor environments – on overview W: Samson R.A., Flannigan B., Flannigan M.E., Verhoeff A.P., Adan O.C.G., Hoekstra E.S. (ed.) *Health implications of fungi in indoor environments*. Wyd. Elsevier, Amsterdam, 3-28.
- Flannigan B., Samson R.A., Miller J.D. (2001a) *Microorganisms in home and indoor environments*. Wyd. Taylor&Francis. London (GB) and New York (USA).
- Flappan S.M., Portnoy J., Jones P., Barnes C. (1999) Infant pulmonary hemorrhage in a suburban home with water damaged and mold (*Stachybotrys atra*). *Environmental Health Perspectives* 107: 927-930.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O. (1983) Classification of terverticillate penicillia based on profile of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 1301-1310.
- Frisvad J.C., Thrane U. (1987) Standardised high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (Diode Array Detection). *Journal of Chromatography* 404: 195-214.
- Frisvad J.C., Samson R.A. (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology* 49: 1-174.
- Garcia B.E., Comtois P., Borrego P.C. (1995) Fungal content of air samples from asthmatic childrens' homes in Mexico city. *Aerobiologia* 11: 95-100.
- Gareis M. (2002) Diagnostik von Nahrung- und Futtermitteln Sowie Umweltproblem mit Einem Biologischen Indikatorsystem auf Zellkulturbasis (MTT test). VI Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Mikotoksyny i dioksyny a środowisko Bydgoszcz: 27-31.

- Gaylarde C.C., Morton L.H.G. (1999) Deteriogenic biofilms on buildings and their control: review. *Biofouling* 14: 59-74.
- Gioulekas D., Damialis A., Papakosta D., Spieksma F., Gioulekas P., Patakas D. (2004) Allergenic fungi spore records (15 years) and sensitization in patients with respiratory allergy in Thessaloniki – Greece. *Journal of Investigation Allergology and Clinical Immunology* 14: 225-231.
- Goliński P. (2010) Dlaczego grzyby tworzą mikotoksyny? XVII Konferencja naukowa Grzyby mikroskopowe i ich metabolity, Poznań: 4.
- Gomez-Alarcon G., Munoz M.L., Flores M. (1994) Excretion of organic acids by fungal strains isolated from decayed sandstone. *International Biodeterioration and Biodegradation* 34: 169-180.
- Goodwin C.J., Holt S.J., Downes S., Marshall N.J. (1995) Microcultures tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts: XTT and MTT. *Journal of Immunological Methods* 179: 95-103.
- Górny R. (2004a) Biologiczne czynniki szkodliwe: normy, zalecenia i propozycje wartości dopuszczalnych. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 3(41): 17-39.
- Górny R. (2004b) Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air – a review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 11: 185-19.
- Górny R. (2009) Aerozole biologiczne – rola normatywów higienicznych w ochronie środowiska i zdrowia. V Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 91-102.
- Górny R., Reponen T., Willeke K., Robine E., Boissier M., Grinshpun S.A. (2002) Fungal fragment as indoor biocantaminants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3522-3531.
- Grajewski J. (2006) Mikotoksyny i grzyby pleśniowe – zagrożenie dla człowieka i zwierząt. Wyd. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Bydgoszcz.
- Grajewski J., Twarużek M. (2004) Zdrowotne aspekty oddziaływania grzybów pleśniowych i mikotoksyn. *Alergia* 3: 45-49.
- Grant C., Hunter C.A., Flannigan B., Bravery A.F. (1989) Water activity requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *International Biodeterioration* 25: 259-284.
- Gravesen S., Nielsen P.A., Iversen R., Nielsen K.F. (1999) Microfungal contamination of damp buildings - examples of risk construction and risk materials. *Environmental Health Perspectives* 107: 505-508.
- Gräbsch C., Wichmann G., Loffhagen N., Herbarth O., Müller A. (2006) Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology* 21(2): 111-117.

- Gutarowska B. (1999) Ergosterol jako wskaźnik zanieczyszczenia grzybami strzępkowymi surowców roślinnych. Praca doktorska, Politechnika Łódzka, Łódź.
- Gutarowska B. (2010) Metabolic activity of moulds as a factor of building materials biodegradation., Polish Journal of Microbiology, 59 (2): 119-124.
- Gutarowska B., Czyżowska A. (2009) The ability of filamentous fungi to produce acids on indoor building materials. Annals of Microbiology 59 (4): 807-813.
- Gutarowska B., Piotrowska M. (2007) Methods of mycological analysis in buildings. Building and Environment 42: 1843-1850.
- Gutarowska B., Wiszniewska M., Walusiak J., Piotrowska M., Pałczyński C., Żakowska Z. (2005) Exposure to moulds in flats and the prevalence of allergy diseases – preliminary study. Polish Journal of Microbiology 54: 13-20.
- Gutarowska B., Żakowska Z. (2002) Elaboration and application of mathematical model for estimation of mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination. International Biodeterioration and Biodegradation 49: 299-305.
- Gutarowska B., Żakowska Z. (2009) Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. Letters in Applied Microbiology 48(5): 605-610.
- Gwoździński K., Liebermann B., Dahse L. (1991) Effects of tentoxin and dihydrotentoxin on human erythrocytes. Cytobios 67:183-191.
- Hanelt M., Gareis M., Kollarczik B. (1994) Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. Mycopathologia 128: 167-174.
- Hanumegowda, U.W., Dhulipala, V. C., Reddy, C. S., (2002) Mechanism of secalonic acid D-induced inhibition of transcription factor winding to cyclic AMP response element in the developing marine palate. Toxicological Sciences 70: 55-62.
- Hippelein M., Rügamer M. (2004). Ergosterol as an indicator of mould growth on building materials. International Journal of Hygiene and Environmental Health 207: 379-385.
- Hodgson M.J., Morey P.R., Leung W.Y., Morrow L., Miller J.D., Jarvis B.B., Robbins H., Halsey J.F., Storey E. (1998) Building-associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. Journal of Occupational and Environmental Medicine 40: 241-249.
- Hunter C.A., Grant C., Flanniga, B., Bravery A.F. (1988) Moulds in buildings: the air spora of domestic dwellings. International Biodeterioration 24: 81-101.
- Iossifova Y., Reponen T., Bernstein D., Levin I., Zeigler H., Kalra H i in. (2007) House dust (1 → 3)-β-D-glucan and wheezing in infants. Allergy 62: 504-513.

- Iossifova Y., Reponen T., Daines M., Levin L., Khurana Hershey G.K. (2008) Comparison of two analytical methods for detecting (1 → 3)-β-D-glucan in pure fungal cultures and in home dust samples. *Open Allergy Journal* 1: 26-34.
- Jahnz-Różyk K. (2008) Wprowadzenie do alergii na antygeny grzybów pleśniowych. *Polski Merkuriusz Lekarski* 24. Supl. 1: 7-10
- Janińska B. (1996) Warunek punktu rosy jako kryterium oceny termoizolacyjności przegród. *Inżynieria i Budownictwo* 12: 710-713.
- Janińska B. (2000) Grzyby pleśniowe w budynkach mieszkalnych o podwyższonej termoizolacyjności. V Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Mikotoksyny i dioksyny a środowisko, Bydgoszcz: 131.
- Janińska B. (2001) Ocena wpływu elementów mikroklimatu na rozwój grzybów pleśniowych na przykładzie materiałów termoizolacyjnych. VI Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mikologów Budownictwa: Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem, Wrocław-Szklarska Poręba: 41-48.
- Janińska B. (2002) Diagnostyka stanu zapleśnienia budynków. Konferencja Naukowa: Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce' 2001. Warszawa 2002, Wyd. Politechniki Warszawskiej, 139-147.
- Jarvis B.B., Nielsen K.F. (2000) *Stachybotrys* – an unusual mold associated with water damaged buildings. 22nd Mycotoxin-Workshop, Bonn.
- Jarvis B.B., Salemme J., Morais A. (1995) *Stachybotrys* toxins. 1. Natural Toxins 3: 10-16.
- Jarvis B.B., Sorenson W.G., Hintikka E.L., Nikulin M., Zhou Y., Jiang J., Wang S., Hinkley S., Etzel R.A., Dearborn D.G. (1998) Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3620-3625.
- Jeleń H. (2002) Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6569-6574
- Johanning E., Landsbergis P., Gereis M., Yang C.S., Olmsted E., (1999) Clinical experience and results of a sentinel health investigation related to indoor fungal exposure. *Environmental Health Perspectives* 107: 489-494.
- Jussila J., Koulainen H., Kosma V-M., Pelkonen J., Hirvonen M-R. (2002) Inflammatory potential of the spores of *Penicillium spinulosum* isolated from indoor air of moisture-damaged building in mouse lungs. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 12: 137-145.
- Kamiński E., Stawicki S., Wasowicz E. (1974) Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fungi imperfecta*. *Applied Microbiology* 27(6): 1001-1004.

- Kärkkäinen M., Raunio P., Jaakko Rautiainen J., Seppo Auriola S., Kaj Hinke K., Pasanen A.L. (2004) Partial aminoacid sequence of a cellulase-like component with IgE-binding properties from *Stachybotrys chartarum*. *International Archives Allergy and Immunology* 133: 136-144.
- Karpovich-Tate N., Rebrikova N.L. (1991) Microbial communities on damaged frescos and building materials in the cathedral of the nativity of the virgin in the Pafnutii-Borovskii Monastery, Russia. *International Biodeterioration and Biodegradation* 27: 281-296.
- Keblys M., Bernholft A., Höfer C.C., Morrison E., Larsen H. J., Flaoyen A. (2004) The effects of the *Penicillium* mycotoxins: citrin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocyte. *Mycopathologia* 158: 317-324.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. (2001) Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9nd ed. Wyd. CABI Bioscience, CAB International U.K. Biddles Ltd.
- Korpi A., Kasanen J.P., Alarie Y., Kosma V.M., Pasanen A.L. (1999) Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOC) and mixture of five MVOCs. *Archives of Environmental Health* 54: 374-352.
- Korpi A., Pasanen A.L., Pasanen P., Kalliokoski P. (1997) Microbial growth and metabolism in house dust. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40: 19-27.
- Kosińska I. (1998) Grzyby w powietrzu pomieszczeń a zagrożenie zdrowotne. Konferencja naukowa: Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce' 1997, Wyd. Politechniki Warszawskiej, 99-109.
- Krajewski K.J. (2001) Pochodne triazolu jako fungicydy środków ochrony drewna. II Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Łódź: 328-335.
- Kreja L., Seidel H.J. (2002) On cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studies in the human lung cell line A549. *Chemosphere* 49: 105-110.
- Krivobole S., Oliver Ph., Marzin D.R., Seigle-Murandi F., Steiman R. (1987) Study of the genotoxic potential of 17 mycotoxins with the SOS Chromotest. *Mutagenesis* 2(6): 433-439.
- Krzysztofik B. (1992) Mikrobiologia powietrza, Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Kubik J., Wyrwał J. (2009) Podstawy fizyki materiałów budowlanych. W: praca zbiorowa pod kierunkiem Klemm P. Budownictwo ogólne. Tom. 2. Fizyka budowli. Wyd. Arkady, Warszawa, 10-50.
- Kuroczkin J., Bode K., Petersen K., Krumbein W.E. (1988) Some physiological characteristics of fungal isolated from sandstones. W: Proc. VI International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń: 21-25.
- Kurup V.P., Banerjee B. (2000b) Fungal allergens and peptide epitopes. *Peptides* 21: 589-599.

- Kurup V.P., Shen H.D., Banerjee B. (2000a) Respiratory fungal allergy. *Microbes Infection* 2: 1101-1110.
- Kurup V.P., Shen H.D., Vijay H. (2002) Immunobiology of fungal allergens. *International Archives Allergy and Immunology* 129: 181-188.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lander F., Meyer H.W., Norn S. (2001) Serum IgE specific to indoor moulds, measured by basophil histamine release, is associated with building-related symptoms in damp buildings. *Inflammation Research* 50 (40): 227-231.
- Larssen T.O., Frisvad J.C. (1994) Production of volatiles and presence of common indoor *Penicillia* and *Aspergilli*. Health implications of fungi in indoor environments. *Air quality monographs*, vol. 2. wyd Elsevier.
- Lehtomäki K., Tukiainen E., Seuri M., Husman T., Nevalainen A. (1999) Symptoms of workers employed in damp buildings. *Indoor Air* 1: 86-91.
- Lewis C.W., Smith J.E., Anderson J.G., Freshney R.I. (1999) Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. *Mycopathologia* 148: 97-102.
- Lipiec A. (1997) Grzyby pleśniowe – ważny antygen środowiskowy. *Terapia* 3: 27.
- Lipiec A., (2000) Grzyby w etiologii chorób alergicznych. *Alergologia współczesna* 1 (10): 10-14.
- Lipiec A. (2001) Grzyby-istotny alergen środowiskowy. *Alergia* 3/10. www.alergia.org.pl
- Lis D.O., Pastuszka J.S., Górny R.L. (1997) Występowanie aerozolu bakteryjnego i grzybowego mieszkaniach, biurach i w środowisku zewnętrznym Górnego Śląska. Wyniki wstępne. *Roczniki PZH* 48: 59-68.
- Little S.A., Longbottom J.L., Warner J.O. (1993) Optimized preparation of *Aspergillus fumigatus* extracts for allergy diagnosis. *Clinical Experimental Allergy* 23: 835-842.
- Lutowski K. (1995) Podatność na pleśnienie materiałów wykończeniowych wnętrz mieszkalnych. III Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mikologów Budownictwa: Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem, Szklarska Poręba: 115-122.
- Mari A., Schneider P., Wally V., Breitenbach M., Simon-Nobbe B. (2003) Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests and IgE reactivity of fungal extracts. *Clinical and Experimental Allergy* 33: 1429-1438.
- May E., Lewis F.J., Pereira S., Tayler S., Seaward M.R.D., Allsopp D. (1993) Microbial deterioration of building stone – a review. *Biodeterioration* 7: 109-123.
- McGinnis M.R. (2004) Pathogenesis of indoor fungal diseases. *Medical Mycology* 42: 107-117.

- McGinnis M.R. (2007) Indoor mould development and dispersal. *Medical Mycology* 45: 1-9.
- Meklin T., Husman T., Vepsäläinen A., Vahteristo M., Koivisto J., Halla-Aho J i in. (2002) Indoor air microbes and respiratory symptoms of children in moisture damaged and reference schools. *Indoor Air* 12: 175-183.
- Mercantini R., Marsella L., Lambiase L., Belardi M. (1986) Isolation of keratinophilic fungi from floors in Roman primary schools. *Mycopathologia* 82: 115-120.
- Mędrela-Kuder E. (2000) Sezonowe wahania w występowaniu grzybów w powietrzu sal dydaktycznych oraz w powietrzu otwartej przestrzeni. Konferencja naukowa: Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce 1999. Wyd. Politechnika Warszawska, 139-142.
- Midgley G., Hay R., Clayton Y. (1997) *Mikologia lekarska*. Wyd. Czelej. Lublin.
- Miller J.D., Laflamme A.M., Sobol Y., Lafontaine P., Greenhalgh R. (1988) Fungi and fungal products in some Canadian houses. *International Biodeterioration* 24(2): 103-120.
- Miller J.D., Haisley P.D., Reinhardt J.H. (2000) Air sampling result in relation to extend of fungal colonization of building materials in some water-damaged buildings. *Indoor Air* 10: 146-151.
- Morton G. (2003) Microbiology of paint coatings – some new trends. III Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 1-10.
- Mukherjee R., Moudgil H. (2006) Indoor mould exposure and respiratory health. *Update Allergy and Clinical Immunology* 73: 61-66.
- Mullins J., Seaton A. (1978) Fungal spores in lung and sputum. *Clinical Allergy* 8: 525-533.
- Nakamura M., Ito Y., Ogawa K., Michisui Y., Sato S., Takada M., Hayashi M., Yaginuma S., Yamamoto S. (1995) Stachybotrys, novel endothelin receptor antagonists produced by *Stachybotrys* sp. M6222. 1. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *Journal of Antibiotics* 48: 1389-1395.
- Nevalainen A., Pasanen A.L., Niininen M., Reponen T., Kalliokoski P., Jantunen M.J. (1991) The indoor air quality in Finnish homes with mold problems. *Environmental International* 17: 299-302.
- Niedoszytko M., Chełmińska M., Chełmiński K., Gruchała M., Jassem E. (2004) Testy skórne i testy IgE w alergii na pleśnie. XV Ogólnopolskie Sympozjum Szkoleniowe i Warsztaty Alergologiczne: Alergia pokarmowa i wziewna na pleśnie, Dobieszków: 10-11.
- Nielsen K.F. (2002) Mould growth on building materials. Ph.D. thesis. Technical University of Denmark, Lyngby.
- Nielsen K.F., Gravesen S., Nielsen P.A., Andersen B., Thrane U., Frisvad J.C. (1999) Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia* 145: 43-56.

- Nielsen K.F., Holm G., Utrup L.P., Nielsen P.A. (2004) Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 325-336.
- Nielsen K.F., Madsen J. (2000) Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 898: 227-234.
- Nieminen S.M., Kärki R., Auriola S., Toivola M., Laatsch H., Laatikainen R., Hyvärinen A., VonWright A. (2002) Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and some building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 68(10): 4871-4875.
- Nikulin M., Pasann A.L., Berg S., Hintikka E.L. (1994) *Stachybotrys atra* growth and toxin production in some building materials and fodder under different relative humidities. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3421-3424.
- Niuksza J.P. (1994) Biodeterioration of paper and books. Wyd. Academy of Sciences, St Petersburg.
- Novotny W.E., Dixit A. (2000) Pulmonary hemorrhage in an infant following two weeks of fungal exposure. *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine* 154: 271-275.
- Ogawa K., Nakamura M., Hayashi M., Yaginuma S., Yamamoto S., Furihata K., Shinya K., Seto H. (1995) Stachybocins, novel endothelin receptor antagonists, produced by *Stachybotrys* sp. M6222.2. Structure, determination of stachybocin A., stachybocin B and stachybocin C. *Journal of Antibiotics* 48: 1396-1400.
- Okudaira M., Kurata H., Sakabe F. (1977) Studies on the fungal flora in the lung of human necropsy cases. A critical survey in connection with the pathogenesis of opportunistic fungus infections. *Mycopathologia* 61: 3-18.
- Okumara H., Yoshino N., Ihara T., Sugamata M., Ueno Y. (2000) Induction of apoptotic cell death by trichotecenes. *Mycotoxins* 50: 41-44.
- Palmer R.J., Siebert J., Hirsch P. (1991) Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building: production by bacterial and fungal isolates. *Microbial Ecology* 21: 253-266.
- Pasanen A.L., Kasanen J.P., Rautiala S., Ikaheimo M., Kaariainen H., Kalliokoski P. (2000) Fungal growth and survival in building materials under fluctuating moisture and temperature conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 117-127.
- Pasanen A.L., Korpi A., Kasanen J.P., Pasanen P. (1998) Critical aspects on the significance of microbial volatile metabolites as indoor pollutants. *Environment International* 24: 703-712.
- Pasanen A.L., Yli-Pietilä K., Pasanen P., Kalliokoski P., Tarhanen J. (1999) Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 138-142.

- Pasanen P., Korpi A., Kalliokoski P., Pasanen A.L. (1997) Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. *Environment International* 23: 425-432.
- Pavlova P., Shimabukuro K., Hisabori T., Growth G., Lill H., Bald D. (2004) Complete inhibition and partial re-activation of single F1-ATP-ase molecules by tentoxin: new properties of reactivated enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 9685-9688.
- Peat J.K., Dickerson J., Li J. (1998) Effects of damp and mould in the home on respiratory health: a review of the literature. *Allergy* 53: 120-129.
- Pepe O., Sannino L., Palomba S., Anastasio M., Blaiotta G., Villani F., Moschetti G. (2010) Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches. *Microbiological Research* 165 (1): 21-32.
- Piontek M. (2001) Pleśnie występujące w obiektach budowlanych w województwie lubuskim. II Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 86-94.
- Piontek M. (2004) Grzyby pleśniowe i ocena zagrożenia mikotoksycznego w budownictwie mieszkaniowym. Wyd. Uniwersytetu Zielonogórskiego, Zielona Góra. Rozprawa habilitacyjna.
- Piontek M., Bednar K. (2006) Wzrost liczby zapleśniałych obiektów budowlanych przez występowanie grzybów pleśniowych w nowym budownictwie z nowoczesnymi technologiami. *Ochrona przed Korozją* 9s/A: 184-187.
- Piotrowska M., Żakowska Z., Bogusławska-Kozłowska J. (2001a) Liczba drobnoustrojów jako kryterium stanu zagrzybienia przegród budowlanych. VI Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mikologów Budownictwa: Ochrona obiektów budowlanych przed korozją biologiczną i ogniem. Wrocław-Szklarska Poręba: 101-104.
- Piotrowska M., Żakowska Z., Gliścińska A., Bogusławska-Kozłowska J. (2001b) Rola mikroflory powietrza zewnętrznego w kształtowaniu bioaerozlu grzybowego pomieszczeń zamkniętych. II Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 113-118.
- Piotrowska M., Żakowska Z. (2003) Oporność klejów do tapet na działanie grzybów pleśniowych. III Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 159-161.
- Piotrowska M., Żakowska Z. (2007) Grzyby strzępkowe. W: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (ed.) *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Tom 1.* Wyd PWN Warszawa, 60-83.
- Piotrowska M., Żakowska Z. (2008) Mikotoksyny w żywności, zagrożenia zdrowotne. W: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (ed.) *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. Tom 2.* Wyd. PWN, Warszawa, 289-303.
- Pitt J.I. (2000) Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56: 184-192.

- Platt S.D., Martin C.J., Hunt S.M., Lewis C.W. (1989) Damp housing mold growth and symptomatic health state. *British Medical Journal* 298: 1673-1678.
- Pogorzelski J.A. (2009) Zagadnienia ciepłno-wilgotnościowe przegród budowlanych. W: praca zbiorowa pod kierunkiem Klemm P. Budownictwo ogólne. Tom. 2. Fizyka budowli. Wyd. Arkady, Warszawa, 105-361.
- Rao, C.Y., Fink R.C., Wolfe, L.B., Liberman, D.F., Burge, H.A. (1997) A study of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* growing on wallboard. *Journal of American Biology Safety Association* 2: 36-42.
- Rao C.Y., Cox-Ganser J.M., Chew G.L., Doekes G., White S. (2004) Use of surrogate markers of biological agents in air and settled dust samples to evaluate a water-damaged hospital. *Indoor Air* 15: 89-97.
- Rautiala S., Reponen T., Hyvarinen A., Nevalainen A., Husman T., Vehvilainen A., Kalliokoski P. (1996) Exposure to airborne microbes during the repair of moldy buildings. *American Industrial Hygiene Association Journal* 57: 279-284.
- Reijula K.E., Kurup V.P., Fink J.N. (1991) Ultrastructural demonstration of specific IgG and IgE antibodies binding to *Aspergillus fumigatus* from patients with aspergillosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 87: 683-688.
- Ren P., Ahearn D.G., Crow S.A. (1999) Comparative study of *Aspergillus* mycotoxin production on enriched media and construction material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 209-213.
- Reponen T., Górny R.L., Cho S.H., Grinshpun S.A., Willeke K., Schmechel D., Huttunen K., Nevalainen A., Hirvonen M.R. (2002) Release and biological reactivity of airborne fungal fragments. W: *Proceedings of 21st Annual Conference of the American Association for Aerosol Research*, Charlotte: 9.
- Richard J.L., Plattner R.D., Mary J., Liska S. L. (1999) The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* 146: 99-103.
- Richardson M.D., Warnock D.W. (1995) *Grzybice. Rozpoznanie i leczenie*. Wyd. Springer, PWN, Warszawa.
- Roggo B.E., Petersen F., Sills M., Roesel J.L., Moerker T., Peter H.H. (1996) Novel spirodihydrobenzofuranlactams as antagonists of endothelin and as inhibitors of HIV-1 protease produced by *Stachybotrys* sp. 1. Fermentation, isolation and biological activities. *Journal of Antibiotics* 49: 13-19.
- Rylander R., Lin R-H. (2000) (1→3)-β-D-glucan – relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. *Toxicology* 152: 47-52.
- Rymsza B. (2003) *Biodeterioracja pleśniowa obiektów budowlanych*. Wyd. Politechniki Poznańskiej, Poznań. Rozprawa habilitacyjna.
- Rymsza B. (2005) Biodeterioracja pleśniowa – nieszczęście, którego można uniknąć. *Alergeny* 1/23: 39-43.

- Ryniecki A. (1999) Warunki bezpiecznego przechowywania. W: Ryniecki A., Szymański P. (Ed) Dobrze przechowywane zboże. Wyd. MR INFO Towarzystwo Umiejętności Rolniczych, Poznań, 14-15.
- Sabater-Vilar M., Nijmeijer S., Fink-Gremmels J. (2003) Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen, and verrucosid) produced by molds isolated from fermented meats. *Journal of Food Protection* 66: 2123-2129.
- Sakamoto K., Tsujii E., Miyauchi M., Nakanishi T., Yamashita M., shigematsu N., Tada T., Izumi S., Okuhara M. (1993) FR901459, a novel immunosuppressant isolated from *Stachybotrys chartarum* No. 19392 –Fermentation, isolation, physicochemical properties and biological activities. *Journal of Antibiotics* 46: 1788-1798.
- Samson R.A., Flannigan B., Flannigan M.E., Verhoeff A.P., Adan O.C.G., Hoekstra E.S. (1994) Air quality monographs. Vol.2: Health implications of fungi in indoor environments. Wyd.Elsevier.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (2000) Introduction to food and air borne fungi. Wyd. Centraalbureau voor schimmelcultures. Utrecht, The Netherlands.
- Sanchez H., Bush R.K. (2001) A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Revista Iberoamericana de Micologia* 18: 56-59.
- Schata M., Jorde W., Elixmann J.H., Linsken H.F. (1989) Allergies to molds caused by fungal spores in air conditioning equipment. *Environmental International* 15: 177-179.
- Schwab C.J., Cooley J.D., Jumper C.J., graham S.C., Straus D.C. (2004) Allergic inflammation induced by a *Penicillium chrysogenum* conidia-associated allergen extract in a murine model. *Allergy* 59: 758-765.
- Seifert K.A., Frisvad J.C. (2000) *Penicillium* on solid wood products. W: Samson R.A., Pitt J.I. (ed.) Integration of modern taxonomic method from *Penicillium* and *Aspergillus* classification, wyd. Harwood Academic Publisher, Amsterdam, 285-298.
- Seo S.C., Grinshpun S.A., Iossifova Y., Schmechel D., Rao C., Reponen T. (2007) A new field-compatible methodology for the collection and analysis of fungal fragments. *Aerosol Science Technology* 41: 794-803.
- Seo S.C. Reponen T., Levin L., Brochelt T., Grinshpun S.A. (2008) Aerosolization of particulate (1 → 3)-β-D-glucan from moldy materials. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3): 585-593.
- Seo S.C. Reponen T., Levin L., Grinshpun S. A. (2009) Size-fractionated (1 → 3)-β-D-glucan concentrations aerosolized from different moldy building materials. *Science of the Total Environment* 407(2): 806-814.
- Seweryn E., Pietkiewicz J., Szamborska A., Gamian A. (2007) Enolaza na powierzchni komórek eukariota i prokariota jako receptor plazminogenu ludzkiego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61: 672-682.

- Shen H.D., Chou H., Tam M.F., Chang C.Y., Lai H.Y., Wang S.R. (2003) Molecular and immunological characterization of Pen ch18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium chrysogenum*. *Allergy* 58: 993-1002.
- Simon-Nobbe B., Denk U., Pöll V., Rid R., Breitenbach M. (2008) The spectrum of fungal allergy. *International Archives Allergy and Immunology* 45(1): 58-86.
- Singh J. (1994) *Building mycology*. Wyd. Chapman and Hall, London.
- Singh J. (2001) Occupational exposure to moulds in buildings. *Indoor Built Environment* 10: 172-178.
- Singh, J. (2005) Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor Built Environment* 14: 229-234.
- Singh K., Frisvad J.C., Thrane U., Mathur S.B. (1991) An illustrated manual of identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins, Technical University of Denmark, 6-19.
- Smith J.E., Anderson J.G., Lewis C.W., Murad Y.M. (1992) Cytotoxic fungal spores in the indoor air atmosphere of the damp domestic environment. *FEMS Microbiology Letters* 100: 337-344.
- Smoragiewicz W., Cossette B., Boutard A., Krzystyniak K. (1993) Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation system in office buildings. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 65: 113-117.
- Smyk B., Rywotycki R. (1993) Mikroorganizmy występujące w uprzemysłowionym budownictwie mieszkaniowym i ich wpływ na zdrowie człowieka. III Konferencja Naukowa: Biozanieczyszczenia w budynkach a zdrowie, Zeszyty Naukowe 35, wyd. Akademia Wychowania Fizycznego, Kraków: 212-224.
- Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W. (2007) *Biologia*. Wyd. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa, 481-490.
- Sorenson W.G., Frazier D.G., Jarvis B.B., Simpson J., Robinson V. (1987) Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (6): 1370-1375.
- Stefańczyk B., praca zespołowa (2009) *Budownictwo ogólne. Tom 1. Materiały i wyroby budowlane*, Wyd. Arkady, Warszawa.
- Su N.Y., Yu C.J., Shen H.D., Pan F.M., Chow L.P. (1999) Pen c 1, a novel enzymic allergen protein from *Penicillium citrinum*. Purification, characterization, cloning and expression. *European Journal of Biochemistry* 261: 115-123.
- Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R.(2007) A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of mouldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1505-1523.

- Sulyok M., Vishvanath V., Krska R. (2009) Mycotoxins in the indoor environment. 31st Mycotoxin Workshop, Münster: 28.
- Szostk-Kot J. (2005) Włókna i tkaniny W: Zyska B., Żakowska Z. (ed.) Mikrobiologia materiałów. Wyd. Politechnika Łódzka, Łódź, 89-136.
- Śliwowski L. (2009) Mikroklimat wnętrz. W: praca zbiorowa pod kierunkiem Klemm P. Budownictwo ogólne. Tom. 2. Fizyka budowli. Wyd. Arkady, Warszawa, 54-102.
- Tang R.B., Chen Y.S., Chou H., Lee S.S., Tai H.Y., Shen H.D. (2005) cDNA cloning and immunologic characterization of a novel EF-1 β allergen from *Penicillium citrinum*. Allergy 60: 366-371.
- Thelander O., Bjurman J., Boutelje J. (1993) Increase in the content of low molecular carbon hydrates at lumber surfaces during drying and correlation with nitrogen content, yellowing and mould growth. Wood Science Technology 27: 381-389.
- Tuomi T., Saarinen L., Reijula K. (1998) Detection of polar and macrocyclic trichothecene mycotoxins from indoor environments. Analyst 123: 1835-1841.
- Tuomi T., Reijula K., Johnsson T., Hemminki K., Hintikka E.L., Lindroos O., Kalso S., Koukila-Kähkölä P., Mussalo-Rauhamaa H., Haahtela T. (2000) Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. Applied and Environmental Microbiology 66: 1899-1904.
- Twarużek M., Grajewski J., Gareis M., Dietrich R., Miklaszewska B., Kuźmińska K. (2004) Toksyczne skażenie grzybami i mikotoksynami uszkodzonych wodą mieszkań. VII Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Mikotoksyny i patogenne pleśnie w środowisku. Bydgoszcz: 103-108.
- Ueno Y. (1985) Toxicology of mycotoxins. Critical Reviews in Toxicology 14: 99-132.
- Van Lancker F., Adams A., Delmulle B., De Saeger S., Moretti A., Van Peteghem C., De Kimpe N. (2008). Use of headspace SPME-GC-MS for the analysis of the volatiles produced by indoor molds grown on different substrates. Journal of Environmental Monitoring 10: 1127-1133.
- Vanparys Ph., deKok M.C.M., van Schooten F.J. (1995) Genetic toxicology W: Niesink R.J.M., Vries J., Holliger M.A. (ed.) Toxicology. Principles and applications. Wyd. CRC Press.
- VanRee R., Akkerdaas J., Zudmeer L. (2006) Immunoblotting in allergen detection W: Detecting allergens in food. Woodhead Publishing Ltd. 98-108.
- Verhoeff A.P., Strien R.T., Wijnen J.T.M., Brunekreef B. (1995) Damp housing and childhood respiratory symptoms: the role of sensitization to dust mites and moulds. American Journal of Epidemiology 141: 103-110.
- Viitanen H., Bjurman J. (1995) Mould growth on wood under fluctuating humidity conditions. Material und Organismen 29: 28-46.

- Vijay H.M., Abebe M., Kumar V., DeVouge M., Schrader T., Thaker A., Comtois P., Escamilla-Garcia B. (2005) Allergenic and mutagenic characterization of 14 *Penicillium* species. *Aerobiologia* 21: 95-103.
- Vishwanath V., Sulyok M., Krska R. (2009a) Validation of an HPLC-MS/MS based multi-analyte method for the determination of fungal and bacterial metabolites in indoor samples. 31st Mycotoxin Workshop, Münster: 40.
- Vishwanath V., Sulyok M., Labuda R., Bicker W., Krska R. (2009b) Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(5): 1355-1372.
- Vojdani A. (2004) Cross-reactivity of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Stachybotrys* antigens using affinity-purified antibodies and immunoassay. *Archives of Environmental Health* 59(5): 256-266.
- Warscheid Th., Braams J. (2000) Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 343-368.
- Wasserbauer R. (2003) Microbial biodeterioration of building materials and constructions. III Konferencja Naukowa: Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych, Łódź: 17-27.
- Ważny J., Karyś J. (2001) Ochrona przed korozją biologiczną. Wyd. Arkady, Warszawa.
- Ważny J., Kundzewicz A. (2009) Możliwości opracowania nano-biocydów dla ochrony drewna. XXIV Sympozjum: Ochrona Drewna, Rogów: 9-18.
- Webb J.S., Nixon M., Eastwood I.M., Greenhalgh M., Robson G.D., Handley P.S. (2000) Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3194-3200.
- Wessen B., Schoeps K.O. (1996) Microbial volatile organic compounds – what substances can be found in sick buildings? *Analyst* 121(9): 1203-1205.
- Whillans F.D., Lamont G.S. (1995) Fungal volatile metabolites released into indoor air environments: variation with fungal species and growth media. W: Morawska L., Bofinger N.D., Maroni M. (ed.) *Indoor Air: an integrated approach*. Elsevier Science Ltd, Oxford, 47-50.
- Widestrand J., Lundh T., Pettersson H., Lindberg J.E. (1999) Cytotoxicity of four trichothecens evaluated by colorimetric bioassays. *Mycopathologia* 147: 149-155.
- Wolhoff P., Wilkins C.K. (1994) Indoor VOCs from household floor dust; comparison of headspace with desorbed VOCs; method for VOC release determination. *Indoor Air* 4: 248-254.
- Zyska B. (1999) Zagrożenia biologiczne w budynku. Wyd. Arkady, Warszawa.

- Zyska B. (2001a) Grzyby powietrza wewnętrznego w krajach europejskich. *Mikologia lekarska* 8 (3-4): 127-140.
- Zyska B. (2001b) Katastrofy, awarie i zagrożenia mikrobiologiczne w przemyśle i budownictwie. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- Zyska B., Żakowska Z. (red.) (2005) *Mikrobiologia materiałów*. Wyd. Politechnika Łódzka, Łódź.
- Żakowska Z., Gutarowska B., Piotrowska M., Wiszniewska M., Pałczyński C. (2004) Zespół chorego budynku. XV Ogólnopolskie Sympozjum Szkoleniowe i Warsztaty Alergologiczne: Alergia pokarmowa i wziewna na pleśnie. Dobieszków:18-19.
- Żakowska Z., Piotrowska M. (2008) Mikroorganizmy w procesach biotechnologicznych. Grzyby strzępkowe. W: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (ed.) *Mikrobiologia techniczna*, Wyd. PWN, Warszawa, 150-178.
- Żakowska Z., Stobińska H. (2000) *Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym*. Wyd. Politechnika Łódzka, Łódź.
- OECD Guideline 476, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4–Health Effects. *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test, OECD, Paris, 1997.
- Allergen Nomenclature, homepage International Union of Immunological Societies Allergen. Nomenclature Sub-Committee. Date updated 07.12.2009. <http://www.allergen.org/>.
- Dyrektywa 67/548/EWG, Gatehouse, 2002.

SUMMARY

Filamentous fungi are common, among others, their active growth is observed on the walls in dwellings, however, there has to be high humidity. On defined microbiological media they show toxinogenic and allergenic properties during their growth, however, these properties can be different during mycelium's growth on the building materials. In routinely conducted mycological researches of dwellings, isolated species of fungi are identified and their toxinogenicity and allergenicity are characterized, but only on the basis of the literature.

Study of 72 dwellings with the evident symptoms of fungal contamination stated that moulds were present on the building partitions on the average level 7×10^7 jtk/100 cm², in the indoor air: 3×10^3 jtk/m³, ergosterol content in the air was on the level 2,6 µg/m³, and showed that the main factor that promotes the moulds growth is a relative humidity of the air amounting to over 60%. It was found that filamentous fungi have developed on the most studied building, finishing and insulation materials. Most moulds have colonized on the organic origin materials, which consisted of cellulose or protein (wood, gypsum cardboard, wallpaper, and upholstery leather). Inorganic materials (mortar, plaster, cement) were not conducive to the moulds growth. Among the fungi colonizing the building partitions, which were also present in the indoor air, the most common moulds belonging to the genera are the following: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Trichoderma*. In the mouldy dwellings, a great amount of variety of moulds was found as well as the dominance of fungi from genera *Aspergillus* (mainly *A.versicolor*, *A.niger*, *A.flavus*).

Residents of mouldy dwellings complained about the numerous symptoms, including common symptoms of allergies and the Sick Building Syndrome (SBS). The species of mould, which have influenced the allergic hypersensitivity were as follows: *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. It was found that the most common allergic reaction the residents experienced was the reaction initiated by the proteins produced by *Penicillium expansum* with molecular weight of 88 kDa and 70 kDa (Pen c 19) and by *Alternaria alternata* with a mass 30 kDa (Alt 1) and 53 kDa (Alt a 10).

Studies of the building partitions in mouldy dwellings had not proved the toxic compounds produced by moulds, and cyto-and genotoxicity. At the same time, the state of health of residents had grounds for formulating the aim of work and to seek the answer to the question: how is the growth, the toxigenicity and the allergenicity of moulds colonizing building and finishing materials which are

currently used in the construction industry; what kind of environment factors influence the manifestation of those features?

Filamentous fungi isolated from the building partitions belonging to the species *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum* growing in laboratory conditions on the microbial medium and on building materials revealed the ability of the synthesis of dangerous to health mycotoxins: aflatoxins, sterigmatocystine, roquefortine C, meleagrine, including many others. Extracts from building materials colonizing by those moulds showed cytotoxicity against mouse fibroblasts in the test MTT / XTT. Cytotoxicity of mould depended on the type and concentration of mycotoxins produced on building materials.

Cytotoxicity of mycotoxins produced on the building materials was greater than the pure preparations of mycotoxins solutions with higher concentration. This effect may be the result of the synergistic effects of toxins and other metabolites produced by moulds in the environment of building materials.

In the laboratory condition it was observed that the building and finishing materials of the organic origin, including cellulose and protein in high humidity condition, facilitated not only to the growth of mould, but also the production of mycotoxins and allergens, however, the above was not confirmed in the case of inorganic materials.

Production of mycotoxins in building materials was activated by the presence of proteins and saccharides which were added in the form of microbiological culture media or house dust.

The inhibition of mould growth and mycotoxin production were found in the cement and gypsum cardboard containing biocides and hydrophobic compounds (silicone).

There was no genotoxicity of building materials contaminated by toxigenic filamentous fungi, or preparations of aflatoxin B1 and sterigmatocystine at concentrations of 100 i 20 µg/ml, to the mouse lymphoma cells (MLA).

Building materials have proved to be a more favorable environment for the production of allergenic proteins than a laboratory culture medium.

39 allergenic proteins produced by moulds growing on building materials were detected, including 16 proteins having the molecular mass of 11 kDa to 93 kDa, not yet classified by the International Union of Immunological Societies allergen Nomenclature Sub-Committee, and 23 classified allergenic proteins. Moreover, it was observed that filamentous fungi growing on building materials produced specific mycotoxins and allergenic proteins, which were not detected during their growth on microbiological culture media, for example: tentoxin, 3 nitropropionic acid and many allergenic proteins. This indicates that there is

a necessity to conduct the studies of toxinogenic and allergenic properties of mould in culture on building materials, within conditions similar to those found in buildings (relative air humidity, dust mite).

It was found that the health risk assessment of inhabitants should include determination of the toxinogenicity, cytotoxicity and allergenicity of mould isolated from the buildings. In these studies, the confirmation of allergic reactions to moulds by immunoblotting method using protein extracts of moulds growing on building materials should be included.

Results obtained in the work indicated that a bad state of health of residents resulted from mouldy dwellings was mainly caused by the allergenic proteins, which were carried on the mycelium particles and spores in the indoor air, and the building materials were favorable substrates for the production of allergens. However, the possibility of the synthesis of mycotoxins by moulds on building materials also provides the risk of the presence of these metabolites in dwellings and their impact on the health of residents.

CHARAKTERYSTYKA ZAWODOWA AUTORA

Dr Beata Gutarowska ukończyła w roku 1992 studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego i otrzymała tytuł magistra o specjalności mikrobiologia. W latach 1992-1994 pracowała w Instytucie Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UŁ na etacie asystenta. W ramach projektu KBN była zatrudniona w Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi w Instytucie Mikrobiologii i Wirusologii.

Od 1994 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Spożywczej i Biotechnologii Politechniki Łódzkiej (obecnie Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności). Pracę doktorską nt. *Ergosterol jako wskaźnik zanieczyszczenia grzybami strzępkowymi surowców roślinnych* wykonywała w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Żakowskiej. Studia doktoranckie ukończyła w 1999 roku; na podstawie decyzji Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności uzyskała stopień doktora nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej. W tym samym roku objęła stanowisko adiunkta w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej, w zespole prowadzącym badania grzybów strzępkowych.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej wykorzystała do opracowania modeli matematycznych wykorzystywanych do oceny zagrzybienia surowców i produktów roślinnych oraz materiałów technicznych w oparciu o metodę oznaczania ergosterolu.

Dr B.Gutarowska jest współautorem eksperckiego programu komputerowego do diagnostyki grzybów strzępkowych. Głównym obszarem zainteresowań naukowych autorki jest korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych. Scharakteryzowała czynniki korozyjne wytwarzane przez pleśnie w środowisku budowlanym oraz określiła rodzaje mikotoksyn i alergenów wytwarzanych przez grzyby strzępkowe na materiałach budowlanych.

Jest współautorem technologii wytwarzania nowych materiałów włókienniczych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych oraz metod ich badania.

Prowadziła również ocenę stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza na stanowiskach pracy w wielu gałęziach przemysłu i środowiskach komunalnych. Współuczestniczyła w opracowaniu konsorcjum mikroorganizmów zdolnych do usuwania związków odorowych ze środowiska pomiotu kurzego i kompostu.

Jej dorobek naukowy obejmuje łącznie 122 prace, w tym 43 oryginalne prace twórcze opublikowane w recenzowanych czasopismach zagranicznych i krajowych z listy filadelfijskiej (16 prac) oraz w recenzowanych czasopismach polskich

(27 prac), 4 prace przeglądowe, 30 prac oryginalnych opublikowanych w materiałach konferencyjnych, 36 doniesień konferencyjnych, 4 rozdziały w podręcznikach, 3 zgłoszenia patentowe, monografię doktorską i habilitacyjną. Była wykonawcą w trzech projektach Urzędu Miasta Łodzi, Rektora PŁ, PEZ-MEiN oraz czterech pracach naukowo-badawczych na zlecenie Urzędu Miasta Warszawa-Bielany, Centralnego Instytutu Ochrony Pracy, Instytutu Włókiennictwa-Łódź oraz firmy Famed. Aktualnie bierze udział w dwóch projektach UE w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego oraz Polskiej Agencji Rozwoju Przedsiębiorczości.

W zakresie działalności dydaktycznej prowadzi wykłady, seminaria i zajęcia laboratoryjne na PŁ z korozji mikrobiologicznej, monitoringu skażeń, hydrobiologii, mikrobiologii, technical microbiology, industrial biotechnology oraz na studiach podyplomowych *Mikrobiologia, higiena i jakość w przemyśle*. Była opiekunem 56 prac magisterskich i inżynierskich oraz 30 prac na studiach podyplomowych. Wyróżniona Nagrodą Rektora PŁ za osiągnięcia dydaktyczno-wychowawcze.

Organizowała międzynarodową konferencję naukową *Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych*, pełniąc czterokrotnie funkcję przewodniczącej komitetu organizacyjnego. Należy do International Biodeterioration Society oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Recenzowała prace dotyczące korozji mikrobiologicznej materiałów technicznych w czasopismach naukowych International Biodeterioration and Biodegradation, Fibres and Textiles in East Europe oraz Ochrona przed Korozją.

